

UNIVERSITE TOULOUSE III - PAUL SABATIER

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III

Discipline : chimie

présentée et soutenue

par

Thibaud MARTIN

le : 12 septembre 2003

**La résistance aux insecticides de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en Afrique de l'Ouest :
du mécanisme à la gestion**

Directeur de thèse : Pr Didier Fournier

JURY

Dr Jean Michel Vassal, Chercheur, Cirad, Montpellier
Dr Robin Gunning, Chercheur, Tamworth Center, NSW, Australia
Dr Denis Bourguet, Chercheur, Inra, Montpellier
Dr René Feyereisen, Directeur de Recherche, Inra, Antibes

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Remerciements

Ce travail a été principalement réalisé en Côte d'Ivoire dans le laboratoire d'entomologie de la Station Coton de Bouaké du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) dont je tiens à remercier l'équipe de Direction pour son accueil et son partenariat avec le Département des Cultures Annuelles du Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD-CA) auquel j'appartiens.

Les expérimentations de terrain ont été conduites en collaboration avec de nombreux agriculteurs cotonniers et maraîchers d'une part et avec les services Recherche/Développement des sociétés cotonnières (CIDT, Ivoire Coton et LCCI) d'autre part qui ont tous participé activement à la collecte d'insectes, au travail de mise en place et aux relevés. Je tiens à leur exprimer toute ma profonde reconnaissance avec une attention particulière à Koffi Niéré, Touré Amadou, Djava Koutouan et Nonkpin Eman.

Merci à Didier Fournier qui a dirigé mes recherches, pour ses visites sur le terrain, sa constante disponibilité et ses précieux conseils. Je lui suis très redevable de m'avoir fait bénéficier de son expérience et de sa grande culture scientifique. Je remercie également l'équipe de son laboratoire pour leur accueil chaleureux lors de mes visites à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Merci à Germain Ochou qui m'a si bien intégré dans son équipe du programme coton du CNRA, pour son esprit de collaboration, sa bonne humeur et ses encouragements. Un grand merci à tout le personnel du laboratoire d'entomologie du CNRA de Bouaké qui m'a aidé à réaliser les élevages et plus particulièrement Marie-José Mouso, Infebhe Ouattara, Tiekoura Konate, Kouakou J. Kouakou et tous les journaliers avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je remercie la Direction de l'Institut Pierre Richet de Bouaké pour la mise à disposition de son laboratoire de biochimie et plus particulièrement Fabrice Chandre de l'IRD pour nos discussions passionnantes et ses judicieux conseils.

Je remercie mes collègues du CIRAD qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien ce travail, notamment Maurice Vaissayre, Patrice De Vernou, Michel Giret, Philippe Menozzi, Jean-Philippe Deguine, Jacques Pages, Jean Luc Khalfaoui, Alain Capillon et tout particulièrement Jean-Michel Vassal et son équipe qui m'ont si bien accueilli dans leur laboratoire du CBGP à mon retour de Côte d'Ivoire.

Merci à tous les collègues entomologistes coton d'Afrique de l'Ouest notamment Hala N'Klo de Côte d'Ivoire, André Kathary et Angelo Djihinto du Bénin, Hema Omer et Doulaye Traore du Burkina Faso, Alphonse Yombouno de Guinée, Boubou Bagayoko et Mamoutou Togola du Mali, Badiane Djibril du Sénégal, Gbakenou Koffi du Togo pour leur esprit de collaboration qu'illustre si bien le projet régional PR-PRAO que nous avons battu et conduit ensemble pendant quatre ans.

Un grand merci à Robin Gunning du NSW Agriculture of Tamworth, qui m'a fait l'honneur de venir d'Australie pour participer à mon jury et d'être rapporteur de cette thèse et à Dereck Russell du NRI, U.K. Leurs conseils, leurs critiques et leurs corrections à la lecture de mes articles ont été inestimables.

Je suis reconnaissant envers les firmes phytosanitaires et plus particulièrement les représentants de Bayer Cropscience, Dow Agrosience, Calliope, Syngenta et de leurs filiales africaines pour leur aide matériel et financière.

Mes remerciements vont également à René Feyereisen et Denis Bourguet de l'INRA pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire parti de mon jury.

Enfin et surtout, mes plus profonds remerciements vont à Armelle, mon épouse et mes enfants Hugo, Hadrien et Alice qui sont restés à mes cotés en toutes circonstances et pour l'amour, la confiance, la compréhension qu'ils m'ont témoigné tout au long de cette aventure.

« Pourquoi travaillez vous ? Moi je soutiens que le seul but de la science consiste à soulager les peines de l'existence humaine. »

Bertolt Brecht, La vie de Galilée.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ARTICLES EN ANNEXES.....	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
1. INTRODUCTION	10
1.1. La Noctuelle <i>Helicoverpa armigera</i>	10
1.2. Les méthodes de lutte.....	11
1.3. L'historique de la lutte chimique.....	12
1.4. Le suivi de la sensibilité de <i>H. armigera</i> aux insecticides	14
2. LA RÉSISTANCE DE <i>H. ARMIGERA</i> AUX PYRÉTHRINOÏDES	14
2.1. Définitions	14
2.2. Les souches	15
2.3. Le diagnostic de la résistance	15
2.4. Une résistance croisée aux autres pyréthrinoides	17
2.5. L'évolution saisonnière	17
2.6. La répartition géographique de la résistance	18
2.7. La résistance croisée aux autres familles chimiques.....	20
2.7.1. Le DDT.....	20
2.7.2. L'endosulfan	21
2.7.3. Les organophosphorés	21
2.7.3. Les autres familles chimiques	22
2.8. Discussion.....	22
3. LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX PYRÉTHRINOÏDES	24
3.1. Introduction.....	24
3.2. Des indicateurs du mécanisme de résistance.....	25
3.2.1. La résistance croisée au DDT	25
3.2.2. La résistance croisée aux autres pyréthrinoides.....	26
3.2.3. Les synergistes.....	27
3.3. La dégradation enzymatique.....	28
3.3.1. Les oxydases	28
3.3.2. Les glutathion-S-transférases.....	30
3.3.2. Les estérases	30
3.4. Le suivi du mécanisme de résistance chez les populations de terrain.....	30

3.5. La répartition de la résistance dans une population de terrain	31
3.8. Discussion	33
4. LES SYNERGIES DES MÉLANGES PYRÉTHRINOÏDES PLUS ORGANOPHOSPHORÉS.....	35
4.1. Introduction.....	35
4.2. La méthode d'analyse.....	36
4.3. Les insecticides seuls	37
4.4. Les mélanges synergisant	37
4.4.1. La toxicité des mélanges	37
4.4.2. Les interactions entre pyréthrinolde et organophosphoré	38
4.5. L'effet synergique du mélange deltaméthrine plus triazophos	38
4.6. Discussion	39
5. L'ANTI-RÉSISTANCE	46
5.1. Introduction.....	46
5.2. La méthode de quantification du triazophos oxon	47
5.3. Le dosage du triazophos oxon.....	48
5.4. Discussion	49
6. LA GESTION DE LA RÉSISTANCE	50
6.1. Introduction.....	50
6.2. La stratégie de gestion de la résistance en culture cotonnière	51
6.2.1. Les alternatives aux pyréthrinolides	51
6.2.2. Les mélanges synergisant.....	52
6.3. L'impact de la gestion de la résistance.....	52
6.3.1. L'évolution de la résistance.....	52
6.3.2. Les infestations de <i>H. armigera</i>	53
6.3.2. Le coût de la résistance.....	54
6.4. Les traitements sur seuils	55
6.5. Discussion	55
7. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	57
BIBLIOGRAPHIE	62
PHOTOS	75

LISTE DES ARTICLES EN ANNEXES

Article 1 : Martin, T., G. O. Ochou, N. F. Hala, J. M. Vassal & M. Vaissayre 2000. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa, *Pest Management Science*, 56, 549-554.

Article 2 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2002. Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 16-19.

Article 3 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Monitoring of the insecticides resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) from 1998 to 2002 in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 2, 51-55.

Article 4 : Martin, T., F. Chandre, G. O. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pest Biochem Physiol.*, vol 74/1 p 17 - 26.

Article 5 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Organophosphorus insecticides synergise pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *J. Econ. Entomol.*, 96, 2, 469-474.

Article 6 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hübner) to triazophos in West Africa. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 33, 883-887.

Article 7 : Ochou, O. G., T. Martin & N. F. Hala 1998. Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, West Africa, *In World Cotton Research Conference No. 2 September 6-12, 1998 Athens, Greece* pp. 833-837.

Article 8 : Ochou, O. G. & T. Martin 2002. Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner): Recent Developments and Prospects for its Management in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 1, 10-16.

Article 9 : Ochou, O. G. & T. Martin 2003. Activity spectrum of Spinosad and Indoxacarb: Rational for a differential resistance management strategy in West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 2, 75-81.

Article 10 : Martin, T., O. G. Ochou, A. Djihinto, D. Traore, M. Togola, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Insecticide Resistance Management succeeds in controlling pyrethroid resistant bollworm populations in West Africa. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, (sournis)

LISTE DES ABREVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase
CIRAD	Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement
CIDT	Compagnie Ivoirienne Des Textiles
CNRA	Centre National de Recherche Agronomique de Côte d'Ivoire
DDT	Dichloro diphenyl trichloréthane
DEF	S-S-S tributyl phosphorotrithioate
DL ₅₀	Concentration Létale entraînant la mort de 50% des individus
FR ₅₀	Facteur de Resistance à la DL ₅₀
GST	Gluthation-S-tranférase
IC ₅₀	Index de Combinaison d'un mélange entraînant la mort de 50% des individus
IRD	Institut de Recherche Pour le Développement
<i>kdr</i>	Knockdown resistance
m.a.	matière active technique
OP	Organophosphoré
PBO	Piperonyl butoxide
PRPRAO	Projet Régional de Gestion et de Prévention de la Résistance de <i>Helicoverpa armigera</i> aux pyréthrinides en Afrique de l'Ouest

La résistance aux insecticides de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en Afrique de l'Ouest : du mécanisme à la gestion

1. INTRODUCTION

1.1. La Noctuelle *Helicoverpa armigera*

Le Lépidoptère *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) appartient à la famille des Noctuidae, sous famille des Heliothinae (photo 1). *H. armigera* est l'espèce la plus répandue occupant l'Europe, l'Afrique, l'Asie et l'Australie (Hardwick, 1965). C'est un insecte polyphage recensé sur plus de 217 plantes hôtes appartenant à 50 familles (Nibouche, 1994).

Au laboratoire les adultes ont une longévité moyenne de 7 jours. Leur activité est essentiellement nocturne. La fécondité des femelles est potentiellement élevée. L'oviposition s'effectue préférentiellement sur des plantes hôtes au stade floraison. Indépendamment du stade phénologique, il existe des différences d'attractivité entre les plantes hôtes (Nibouche, 1994). En Australie les adultes peuvent se déplacer à l'intérieur du couvert végétal, entre différents habitats ou sur de longues distances (Farrow et Daly, 1987). Contrairement aux autres noctuelles, *H. armigera* est capable à la fois de diapause et de migrer (Cayrol *et al.* 1974). *H. armigera* est un migrant facultatif qui se déplace sur de longues distances lorsque les ressources alimentaires du milieu deviennent insuffisantes (Fitt, 1989). Lorsque le chevauchement des cultures permet une alimentation continue, l'espèce serait plutôt sédentaire comme dans certaines régions d'Afrique du Sud (Parsons, 1940) et du Soudan (Topper, 1987).

H. armigera a six stades larvaires suivis d'un stade pré nymphal durant lequel l'alimentation cesse et la chenille cherche à s'enterrer (Reed, 1965). La durée moyenne de la vie larvaire est de 21 jours entre 21° et 27°C. La pré nymphe s'enfonce dans le sol à une profondeur moyenne de 5 cm. La nymphose dure environ une quinzaine de jours. Une diapause photopériodique a été mise en évidence au Burkina Faso, en zone intertropicale (Nibouche, 1994). Par contre l'absence d'aptitude diapausante a été constatée chez certaines populations d'origine tropicale, notamment en Côte d'Ivoire (Hardwick, 1965). La durée totale du cycle de *H. armigera* varie de 40 jours à 25°C à 27 jours à 30°C et dépend du substrat alimentaire (Hmimina, 1988).

En Côte d'Ivoire j'ai trouvé des larves de *H. armigera* principalement sur les cultures de coton (*Gossypium hirsutum*) pendant la saison des pluies et de tomate (*Lycopersicum esculentum*) pendant la saison sèche (photo 1). Suivant les périodes et les régions on le trouve aussi sur le gombo

(*Hibiscus esculentus*) et le muflier (*Antirrhinum majus*). Sur le cotonnier, les larves attaquent les boutons floraux, les fleurs et les capsules. En cas de forte infestation, lorsque tous les organes floraux et fructifères sont détruits, les chenilles peuvent s'attaquer aux feuilles et aux bourgeons terminaux des plantes. Une larve de sixième stade est responsable de 82% de la quantité totale de matière fraîche consommée pendant la vie larvaire et consomme en moyenne 22 boutons floraux ou 3 à 7 capsules de cotonnier (Nibouche *et al.*, 2003). Sur tomate, plusieurs fruits sont attaqués durant la vie larvaire, généralement sur le même bouquet (Poitout et Bues, 1979). A la dépréciation du fruit, du fait de la présence d'une galerie, s'ajoutent des pertes de rendement dues aux chutes de boutons floraux et de jeunes fruits et au développement de pourritures.

L'intensification de la culture cotonnière est considérée comme un facteur qui accroît l'incidence de *H. armigera* (Reed et Pawar, 1982). De même le développement des cultures irriguées de contre saison augmente ses chances de survie pendant la saison sèche (Nyambo, 1988). L'incidence de *H. armigera* en culture cotonnière est influencée par les cultures qui lui sont associées. Lorsque s'achève la floraison des céréales, semées en début de saison des pluies, les populations qui s'y sont développées se reportent sur le cotonnier qui subit alors une infestation maximale (Matthews et Tunstall, 1968 ; Balla, 1982 ; Nibouche, 1994).

1.2. Les méthodes de lutte

Depuis les années 1950, plusieurs méthodes ont été testées et validées sur les cultures cotonnières d'Afrique de l'Ouest pour lutter contre un large spectre parasitaire comprenant cinq Lépidoptères carpophages (*H. armigera*, *Earias* spp., *Diparopsis waltersi* (Rothschild) *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) et *Pectinophora gossypiella* (Saunders)), trois Lépidoptères phyllophages (*Syllepte derogata* Fabricius, *Anomis flava* Fabricius et *Spodoptera littoralis* (Boisduval)), le puceron (*Aphis gossypii* (Glover), la mouche blanche *Bemisia tabaci* (Gennadius) et l'acarier *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)). Les cultures associées (Parsons, 1939 ; Reed, 1965), les plantes pièges (Fang *et al.*, 1989), les lâchers d'entomophages, ont donné des résultats variables suivant les pays (Bournier et Peyrelongue, 1973, Michael, 1989, Camerone et Valentine, 1989). La résistance variétale (Pauly et Vaissayre, 1980) et les techniques culturales (Cauquil, 1985) ont permis de réduire l'intensité des infestations. L'utilisation des entomopathogènes (bacculovirus, Bt) a aussi donné des résultats prometteurs (Montaldo, 1991), mais cette technique n'a jamais été développée en Afrique de l'Ouest, pour des raisons de coût, d'efficacité ou de condition d'utilisation.

Pour des raisons de coût et d'efficacité contre l'ensemble du spectre parasitaire, une lutte chimique raisonnée a été utilisée en Afrique de l'Ouest depuis le début des années 1960 (Angelini

et Vandamme, 1965 ; Angelini et Couilloud, 1976 ; Cauquil, 1981 ; Angelini *et al.* 1982). En règle générale elle était basée sur :

- un programme calendaire de 4 à 6 traitements foliaires appliqués dès le début de la floraison tous les 14 jours avec des appareils à pression entretenue (60 l/ha) ou à piles (10 l/ha) simples à utiliser, faciles à entretenir et peu coûteux,
- des insecticides chimiques ciblés à des doses minimales efficaces,
- des mélanges d'insecticides permettant un contrôle global du spectre parasitaire,
- des formulations insecticides homologuées, solubles dans l'eau, conditionnées en boîtes métalliques et dosées par traitement et par unité de surface cultivée.

Cette méthode de lutte intégrait également :

- des techniques culturales telles que le labour des parcelles pour éliminer les chrysalides enfouies dans le sol (Wilson, 1983), les semis précoces pour éviter les fortes infestations en fin de campagne et la coupe des cotonniers après récolte pour éviter les infestations sur les repousses en début de saison des pluies (Cauquil, 1985) ;
- des caractères variétaux comme la pilosité pour contenir les populations de jassides sans recourir à l'usage de la lutte chimique (Pauly et Vaissayre, 1980).

Cette protection raisonnée de la culture cotonnière a continuellement été améliorée par l'utilisation de nouveaux produits et des techniques d'application plus efficaces, la prise en compte des zones parasitaires, de l'évolution du spectre parasitaire et aussi par la formation des agriculteurs. Mais surtout, pour diminuer l'impact des insecticides sur l'environnement et le coût de la protection, des programmes de traitements sur seuils d'infestation ont été élaborés, adaptés et développés dans tous les pays cotonniers d'Afrique de l'Ouest et du Centre (Ochou et Vaissayre, 1989 ; Deguine *et al.*, 1993 ; Deguine et Ekukole, 1994 ; Nibouche *et al.*, 1998 ; Silvie *et al.*, 2001).

1.3. L'historique de la lutte chimique

En raison de l'organisation des filières nationales en matière d'achat, de distribution et d'utilisation des insecticides et du fonctionnement en réseau des équipes Recherche-développement des sociétés cotonnières, il est possible de retracer l'historique de la lutte chimique en culture cotonnière qui a globalement été la même pour tous les pays francophones d'Afrique de l'Ouest au cours des quarante dernières années. A partir des données de la Côte d'Ivoire (sources CIDI et CIRAD) on peut distinguer quatre grandes périodes :

- **La période 1960-1976** est caractérisée par l'utilisation massive d'organochlorés (75%)

principalement du DDT (7 kg m.a./ha/campagne) seul ou plus généralement associé à l'endrine, à l'endosulfan et/ou aux organophosphorés (méthyl-parathion et monocrotophos). Le nombre moyen de traitements par hectare était de 5,4 avec une quantité moyenne épandue de 11,3 kg m.a./ha/campagne.

- **La période 1977-1985** est caractérisée par la disparition de l'endrine et de l'endosulfan remplacés par des organophosphorés en mélange avec du DDT et la réduction des quantités d'organochlorés utilisés (de 65% en 1977 à 6% en 1985) remplacés progressivement par des pyréthrinoïdes (de 5% en 1977 à 25% en 1985). Les pyréthrinoïdes se limitaient à trois molécules : deltaméthrine, fenvalérate et cyperméthrine. Ces insecticides ont toujours été utilisés en mélange avec des organophosphorés (35% en 1977 à 69% en 1985). De nouveaux OPs ont été homologués : le triazophos, le profénofos et le chlorpyrifos-éthyle. Le nombre moyen de traitements par hectare était de 5,7 avec une quantité moyenne épandue de 4,6 kg m.a./ha/campagne.
- **La période 1986-1997** est caractérisée par l'utilisation exclusive de mélanges pyréthrinoïdes plus organophosphorés. Les organophosphorés représentent en quantité plus des 3/4 des insecticides utilisés. De nouveaux pyréthrinoïdes ont été homologués mais rarement utilisés (cyfluthrine, alpha-cyperméthrine, cyhalothrine et esfenvalérate). Le nombre moyen de traitements par hectare était de 5,8 avec une quantité moyenne épandue de 1,7 kg m.a./ha/campagne.
- **La période 1998-2001** est caractérisée par le retour de l'endosulfan utilisé seul en début de campagne. La quantité d'endosulfan appliquée à l'hectare et par campagne (1,4 kg/ha) représentait plus de la moitié de la quantité totale de matières actives utilisées. Cinq autres produits ont été utilisés : deux pyréthrinoïdes (cyperméthrine et cyfluthrine) et trois organophosphorés (profenofos, diméthoate et chlorpyrifos-éthyle). Le nombre moyen de traitements par hectare était de 6 avec une quantité moyenne épandue de 2,5 kg m.a./ha/campagne.

La culture cotonnière étant de très loin la plus grosse utilisatrice de pesticides en Afrique de l'Ouest, une partie des insecticides qui lui sont destinés sont détournés pour protéger les autres cultures notamment la tomate, le haricot et le gombo. Mais autant les insecticides sont sous-dosés sur le coton pour des raisons évidentes d'économie, autant ils sont abondamment utilisés sur les cultures maraîchères à forte valeur ajoutée. L'absence d'organisation et de suivi dans ces systèmes de culture en expansion rend impossible l'évaluation des quantités épandues.

1.4. Le suivi de la sensibilité de *H. armigera* aux insecticides

Les premiers cas de résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoides ont été observés en Australie (Gunning *et al.*, 1984), puis en Thaïlande (Ahmad et McCaffery, 1988), au Pakistan, en Inde, en Indonésie (McCaffery *et al.*, 1988, 1989 et 1991) en Chine (Shen *et al.*, 1992) et plus récemment en Afrique du Sud (Van Jaarsveld *et al.*, 1998) et en Espagne (Torres-Vila *et al.*, 2002). Depuis le début des années 1980, la sensibilité aux insecticides de la race africaine de *H. armigera* a été suivie par des bioessais réalisés au laboratoire sur des souches collectées sur coton (Renou et Vaissayre, 1979 ; Vaissayre et Lucas-Chevalon, 1989 ; Martin et Renou, 1995). En 1991 un premier cas de résistance à la deltaméthrine a été signalé au Burkina Faso (Nibouche, 1992 et 1993). A la même époque en Côte d'Ivoire la résistance aux pyréthrinoides n'a pas été sélectionnée chez une souche de Bouaké (BK92R) après une pression de sélection à la deltaméthrine sur 10 générations (Alaux, 1994). Mais en 1995 une résistance à la cyperméthrine est observée chez la souche de Bouaké BK95 (Vassal *et al.*, 1997).

2. LA RESISTANCE DE *H. ARMIGERA* AUX PYRETHRINOÏDES

Article 1 : Martin, T., G. O. Ochou, N. F. Hala, J. M. Vassal & M. Vaissayre 2000. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa, *Pest Management Science*, 56, 549-554.

Article 2 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2002. Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 16-19.

Article 3 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Monitoring of the insecticides resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) from 1998 to 2002 in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 2, 51-55.

2.1. Définitions

La résistance est un changement génétique en réponse à une sélection par des toxiques qui peut diminuer l'efficacité d'un contrôle au champ (Sawicki, 1987). Plus explicitement, « la résistance à un insecticide se traduit par une diminution de la mortalité observée dans une population soumise à un traitement constant. Ce phénomène, qui se manifeste par l'apparition d'individus tolérant des doses normalement létales pour les individus dits "sensibles" lors des premières utilisations du produit, repose sur une évolution génétique des populations » (Poirié et Pasteur, 1991).

La Résistance est croisée quand un biotype est résistant à deux ou plusieurs pesticides du fait de la présence d'un mécanisme de résistance commun.

Le développement de la résistance d'après Goulston et Brake (1997) : La résistance est issue d'une variabilité génétique dans les populations. La modification génétique responsable de la résistance peut déjà exister dans une population ou survenir à l'occasion d'une mutation naturelle. Dans une large population, quelques individus peuvent héberger des gènes de résistance. Ils pourront survivre à une dose toxique d'insecticide qui élimine normalement la majorité des individus. Les survivants transmettront leurs gènes à leur descendance. Dans les générations successives, la proportion d'individus résistants peut augmenter rapidement et devenir dominante car, lors de l'utilisation d'un même insecticide, seuls les individus sensibles sont éliminés.

2.2. Les souches

La souche de *H. armigera* BK77 qui m'a servi de référence a été initialement collectée à Bouaké en 1977 donc avant l'utilisation des pyréthrinoïdes. Elle a été maintenue en élevage au CIRAD à Montpellier puis au CNRA à Bouaké.

Les populations sur lesquelles j'ai travaillé ont été collectées dans la zone cotonnière de Côte d'Ivoire (photo 2). La plupart ont été collectées à Bouaké sur les parcelles expérimentales de cotonnier non traité de la station de recherche coton du CNRA et sur différentes cultures traitées ou non, essentiellement la tomate et plus rarement le gombo. Depuis 2001, des populations ont aussi été collectées régulièrement sur muflier, une plante ornementale cultivée à Bouaké dans un périmètre « biologique » non traité.

La méthode d'élevage utilisée est celle mise au point par Couilloud et Giret (1980). Les chenilles sont nourries avec un milieu semi-artificiel et élevées dans une cellule climatique régulée dans les conditions suivantes : température 25°C, humidité relative 70%, photophase de 12h.

Afin d'analyser la résistance, une population de terrain collectée à Bouaké en octobre 1999 (BK99) a été homogénéisée par une sélection à la deltaméthrine (DL_{50}) sur pratiquement chaque génération. Cela a conduit à la souche BK99R9 avec un facteur de résistance à la deltaméthrine de 189 puis à la souche BK99R11 avec un facteur de résistance supérieur à 1000. La souche a été perdue à la 13^{ième} génération en raison des événements politiques.

2.3. Le diagnostic de la résistance

En Côte d'Ivoire, la sensibilité de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes a été suivie chaque année depuis 1985 en testant la deltaméthrine par application topique sur des populations collectées en octobre sur des cotonniers non traités de la station de recherche de Bouaké. L'évolution de la DL_{50} de la deltaméthrine est présentée dans la figure 1.

Trois paliers illustrent l'évolution de la sensibilité de *H. armigera* à la deltaméthrine (fig. 1). Le premier de 1985 à 1988 est au niveau de la DL₅₀ de la souche de référence BK77 indiquant la sensibilité de la population. Le second palier de 1989 à 1995, est à environ 2 fois cette valeur suggérant une perte de sensibilité. Au troisième palier de 1996 jusqu'en 2001, le niveau moyen des DL₅₀ est 10 à 40 fois supérieur à celui de la souche de référence BK77 indiquant une résistance significative à la deltaméthrine.

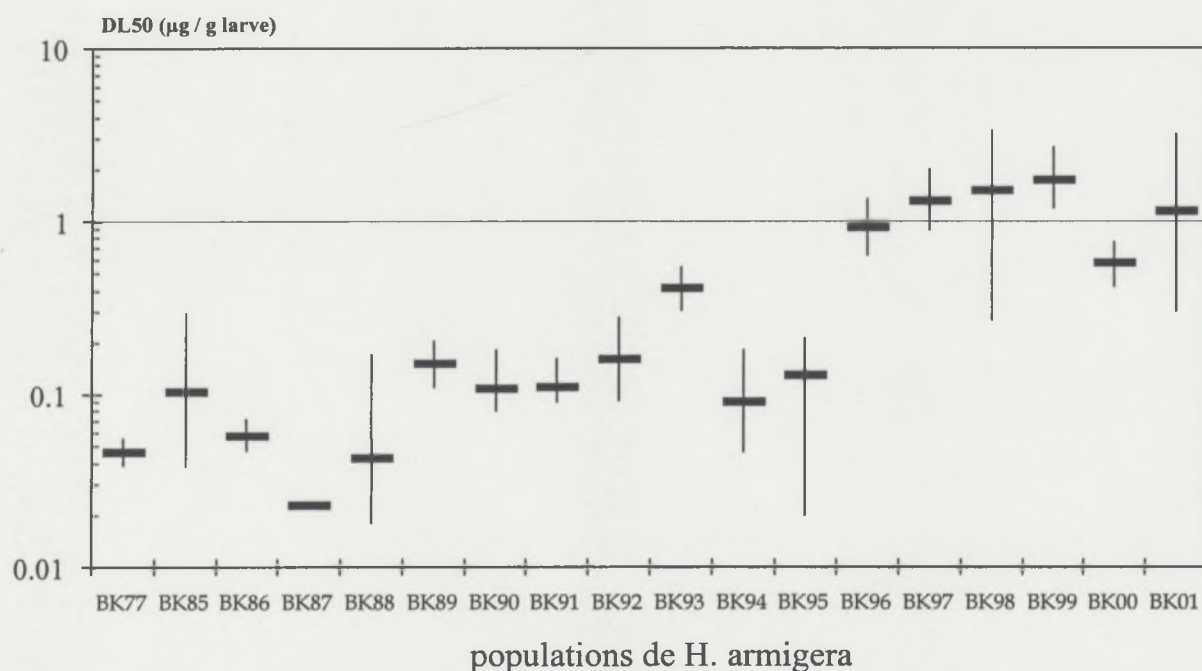


Figure 1: Réponse à la deltaméthrine (DL₅₀ avec ses intervalles de confiance à 95%) des larves de la souche de référence BK77 et des populations de *H. armigera* collectées sur coton en octobre à Bouaké chaque année de 1985 à 2001 (BK85 à BK01).

En 1996 les bioessais ont confirmé la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoides sur plusieurs souches de Côte d'Ivoire (tab. 1).

Tableau 1 : DL₅₀ et facteur de résistance (FR) de 3 pyréthrinoides sur des larves de la souche sensible BK77 et des souches de *H. armigera* collectées sur coton à Bouaké et Niakara en 1996.

Matière active	Souche ^a	DL ₅₀ µg/g	Intervalles de confiance 95%	pente ± es	FR ^b
Deltaméthrine	BK77	0.040	0.023-0.062	1.96 ± 0.85	-
	BK96	0.920	0.630-1.340	1.33 ± 0.30	12
	NK96	0.822	0.521-1.297	1.50 ± 0.28	11
Cyperméthrine	BK77	0.47	0.38-0.58	2.99 ± 0.47	-
	BK96	5.05	3.45-7.40	1.46 ± 0.22	10
	NK96	2.04	1.24-3.36	1.20 ± 0.19	5
Fenvalérate	BK77	0.14	0.11-0.17	3.21 ± 0.62	-
	NK96	10.04	6.52-16.70	1.27 ± 0.19	75

^a BK77: souche sensible, BK96 : souche Bouaké, NK96 : souche Niakara ; ^b Facteur de Résistance (FR), calculé par le rapport de la DL₅₀ souche résistante / DL₅₀ souche sensible.

Les facteurs de résistance des populations de terrain à la deltaméthrine et à la cyperméthrine sont

modérés et comparables à ceux mesurés au Mali (Togola, com. person.). Par contre à la même période au Bénin, au Togo et au Burkina Faso, la résistance a atteint un niveau critique, certaines populations supportant des doses de deltaméthrine et de cyperméthrine 300 à 450 fois plus fortes que la souche de référence BK77 (Kathary *et al.*, 1999 ; Traore *et al.*, 1999).

2.4. Une résistance croisée aux autres pyréthriinoïdes

Les résultats des bioessais des différents types de molécules de la famille des pyréthriinoïdes sur la souche sensible BK77 et la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 sont présentés dans le tableau 2. La souche BK99R9 sélectionnée à la deltaméthrine est 189 fois plus résistante que la souche BK77.

Tableau 2 : DL₅₀ et facteur de résistance (FR) de 7 pyréthriinoïdes sur les larves des souches sensible et résistante de *H. amiger*

Matière active	Souche ^a	DL ₅₀ µg/g	Intervalle de confiance 95%	pente ± es	FR ^b
Deltaméthrine	S	0.055	0.043-0.066	2.16 ± 0.29	-
	R	10.40	6.45-14.07	2.44 ± 0.37	189
Cyperméthrine	S	0.257	0.206-0.299	3.56 ± 0.66	
	R	3.657	1.413-6.195	1.69 ± 0.30	14
Cyfluthrine	S	0.067	0.037-0.091	2.95 ± 0.61	
	R	2.948	0.945-4.691	1.86 ± 0.50	44
Betacyfluthrine	S	0.099	0.064-0.127	3.51 ± 0.69	
	R	1.946	0.965-2.803	2.99 ± 0.59	20
Fenvalérate	S	0.145	0.108-0.176	1.62 ± 0.24	-
	R	23.64	13.47-35.74	1.50 ± 0.22	163
Bifenthrine	S	0.129	0.09-0.14	4.62 ± 1.16	-
	R	1.931	1.299-2.574	2.32 ± 0.34	15
Etofenprox	S	2.937	1.898-3.850	2.91 ± 0.37	-
	R	15.79	9.83-21.72	2.20 ± 0.41	5

^a S pour la souche sensible BK77 et R pour la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9; ^b Facteur de Résistance (FR), calculé par le rapport de la DL₅₀ souche résistante / DL₅₀ souche sensible.

La résistance est positivement corrélée à tous les autres pyréthriinoïdes testés y compris l'étofenprox qui, contrairement aux autres molécules du groupe, n'est pas un ester. La différence de facteur de résistance entre les molécules peut être due à la méthode de sélection de la souche n'utilisant que la deltaméthrine. Ces résultats suggèrent de limiter l'utilisation au champ de tous les pyréthriinoïdes tout en alternant les molécules dans le temps pour limiter la sélection d'individus résistants dans les populations de *H. amiger*.

2.5. L'évolution saisonnière

L'évolution saisonnière de la résistance a été suivie de 1998 à 2002. Les DL₅₀ et les facteurs de résistance (FR) des souches collectées à Bouaké à différentes périodes de l'année sur différentes plantes hôtes sont présentés dans la figure 2.

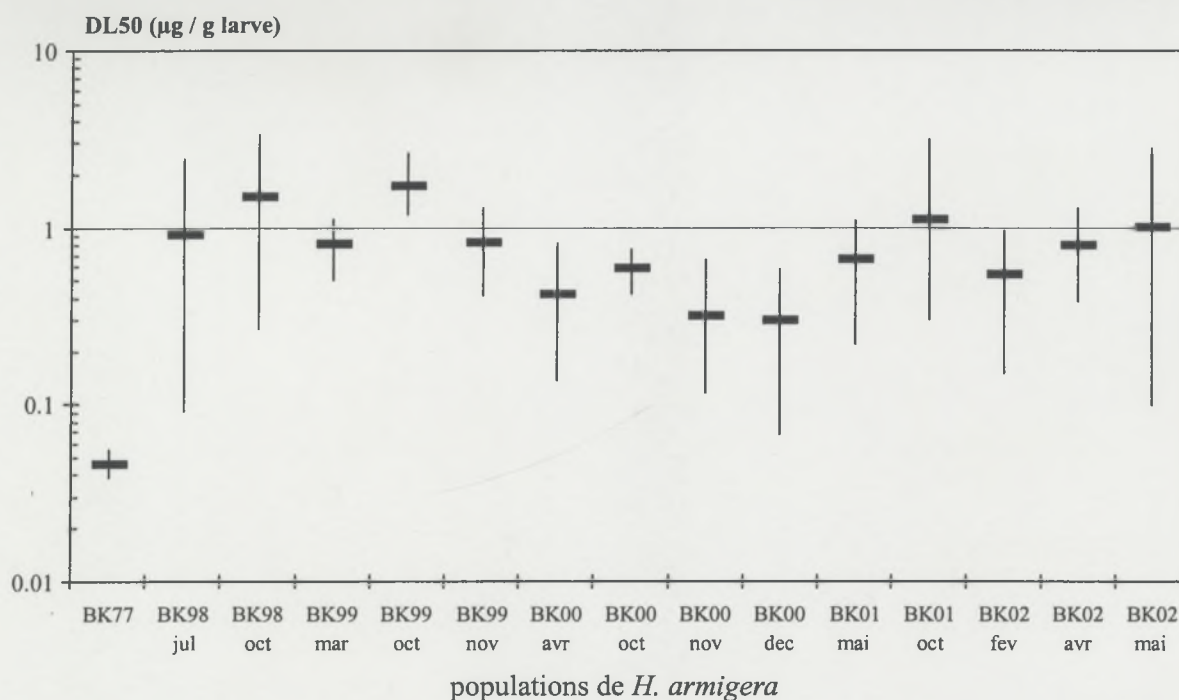


Figure 2 : Réponse à la deltaméthrine des larves de *H. armigera* collectées à Bouaké à différentes périodes de l'année comparée à la celle de la souche sensible BK77

La DL_{50} des populations de terrain est toujours plus élevée en octobre, période qui correspond à la fin des traitements en culture cotonnière. Elle est plus faible pendant l'inter-campagne dès le mois de novembre quelle que soit la plante hôte des populations testées. Ce résultat a également été observé et étudié plus en détail au Bénin (Djihinto *et al.*, à paraître). Le plus fort facteur de résistance ($FR=38$) a été obtenu sur la population collectée en octobre 1999. Généralement il évolue plutôt entre 10 et 20. Depuis 4 ans le niveau de résistance reste faible et relativement stable faisant ainsi la preuve du succès de la stratégie de gestion de résistance.

2.6. La répartition géographique de la résistance

Pour évaluer le niveau de résistance dans d'autres zones de la Côte d'Ivoire, des populations ont été collectées au gré des infestations rencontrées en culture cotonnière et mises en élevage dans le laboratoire de Bouaké. En raison du nombre important de larves que nécessite l'établissement d'une régression dose/mortalité, et des faibles niveaux d'infestation ces bioessais n'ont pu être réalisés que pour quelques populations (fig. 3). Les DL_{50} ont toujours été inférieures à celles obtenues avec les populations de Bouaké.

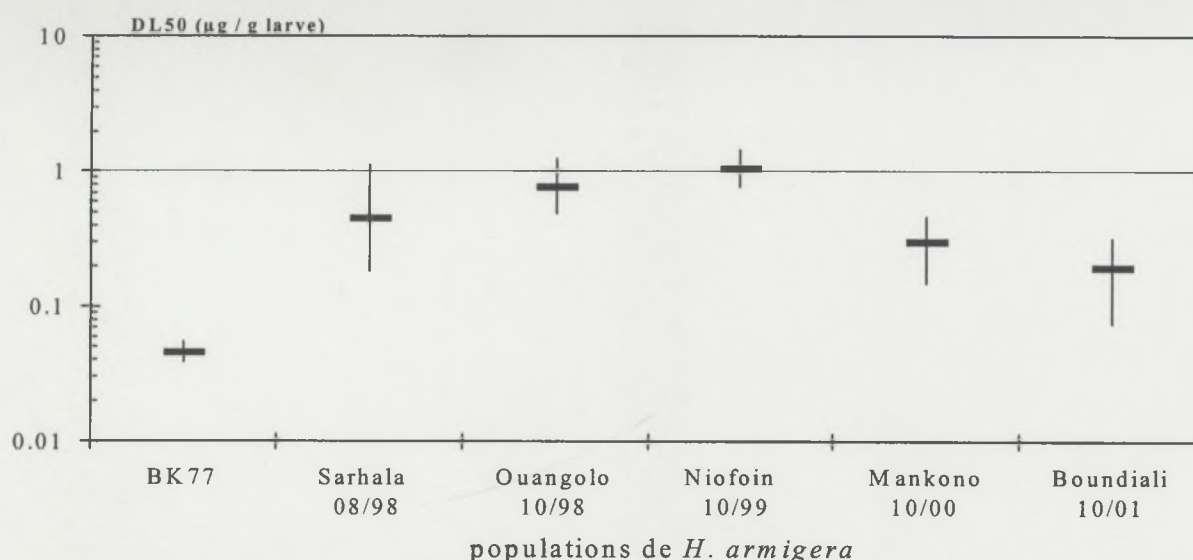


Figure 3 : Réponse de la deltaméthrine sur des larves de *H. armigera* collectées sur coton dans des zones cotonnières fortement infestées de 1998 à 2001.

La technique des flacons imprégnés de cyperméthrine est utilisée chaque année depuis 1998 par les agents d'encadrement. Les larves collectées dans les champs sont placées individuellement dans les tubes traités à la cyperméthrine et non traités pendant 24 h. Les résultats ont montré la présence de 40 à 60% d'individus résistants à 6 µg/tube et de 1 à 30 % à 30 µg/tube dans les populations de *H. armigera* collectées en Côte d'Ivoire en fin de campagne (fig. 4). La dose de 6 µg/tube est létale pour les larves de la souche sensible BK77.

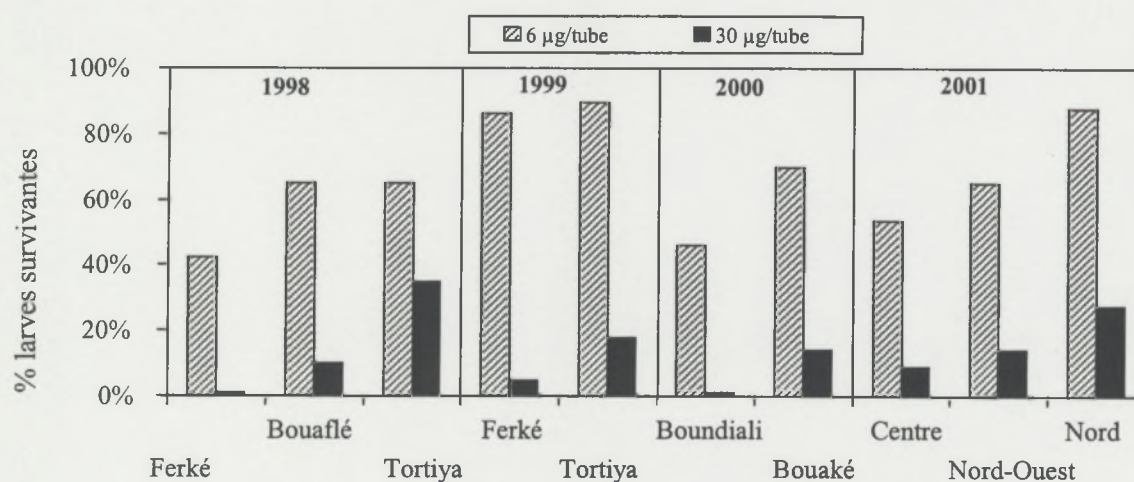


Figure 4 : Résultats des bioessais par tubes imprégnés de 6 et 30 µg/tube de cyperméthrine sur des populations larvaires de *H. armigera* collectées dans différentes zones cotonnières de 1998 à 2001.

Du fait de la baisse des niveaux d'infestations les tests sur les populations de début de campagne n'ont pas pu être effectués. Le niveau de résistance reste faible, le pourcentage de larves résistantes à la forte dose dépassant rarement les 20%. La même technique appliquée au cours de cette période au Bénin, au Burkina Faso, au Togo et au Mali (Vaissayre *et al.*, 2002) place les

populations de la Côte d'Ivoire au rang des moins résistantes. Le dosage des pyréthrinoides dans les tubes de verre stockés 50 jours à une température constante de 31°C indiquent une rémanence acceptable pour la cyperméthrine (84%) mais supérieure pour la deltaméthrine (98%) (Moreira, 2002). Il serait donc préférable dorénavant d'utiliser des tubes imprégnés de deltaméthrine pour suivre la résistance au champ.

2.7. La résistance croisée aux autres familles chimiques

Pour connaître les insecticides encore efficaces sur les populations de *H. armigera* résistantes aux pyréthrinoides, j'ai testé une quinzaine de molécules sur une souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 et sur la souche sensible BK77 (tab. 3).

Tableau 3. DL₅₀ et facteurs de résistance (FR) des insecticides sur les larves de *H. armigera* des souches sensible BK77 et résistante aux pyréthrinoides BK99R9.

Matière active	Souche	pente \pm es	DL ₅₀ (μ g/g)	(95% LC)	FR
DDT (organochloré)	S	2.8 \pm 0.3	59.8	(45.3-73.6)	0.68 ns
	R	1.1 \pm 0.4	41.2	(16.2-154)	
Endosulfan (cyclo diene)	S	1.9 \pm 0.7	26.4	(19.3-39.6)	0.6 ns
	R	2.7 \pm 0.3	16.34	(1.19-20.57)	
Profénofos (OP)	S	5.1 \pm 0.9	6.84	(6.11-7.83)	1.4 s
	R	5.4 \pm 0.8	9.90	(8.50-11.30)	
Fenthion (OP)	S	1.4 \pm 0.3	179	(59-327)	0.4 ns
	R	3.5 \pm 0.5	67	(47-86)	
Ethion (OP)	S	2.4 \pm 0.3	1062	(824-1285)	0.7 ns
	R	3.2 \pm 0.6	781	(447-1056)	
Phosalone (OP)	S	2.1 \pm 0.4	121	(78-185)	0.5 ns
	R	1.7 \pm 0.5	77	(2.2-231)	
Acéphate (OP)	S	10.4 \pm 7.8	121	(78-185)	0.3 s
	R	2.7 \pm 0.7	36.8	(7.5-65)	
Monocrotophos (OP)	S	4.5 \pm 0.8	55	(47-63)	4.2 s
	R	4.3 \pm 1.1	233	(92-336)	
Isoxathion (OP)	S	5.3 \pm 0.7	11	(9.4-12.9)	13 s
	R	1.9 \pm 0.8	143	(35-307)	
Chlorpyrifos éthyle (OP)	S	9.1 \pm 5.1	3.42	(2.43-4.82)	7.6 s
	R	4.6 \pm 0.7	26	(21-30)	
Triazophos (OP)	S	3.4 \pm 0.4	104.9	(39.0-144.9)	0.3 s
	R	1.9 \pm 0.2	27.8	(18.8-37.7)	
Thiodicarbe* (carbamate)	S	1.7 \pm 0.3	3.06	(1.85-4.35)	1.7 ns
	R	1.1 \pm 0.2	5.11	(3.05-7.91)	
Méthoxyfénozide* (antagoniste de l'ecdysone)	S	0.9 \pm 0.1	0.62	(0.27-1.15)	1.2 ns
	R	0.5 \pm 0.1	0.75	(0.14-2.04)	
Indoxacarb (blocage canal sodium)	S	1.7 \pm 0.3	1.1	(0.75-1.5)	2 ns
	R	1.2 \pm 0.3	1.87	(1.1-3.19)	
Spinosad (activateur récepteur nicotinique)	S	1.8 \pm 0.3	0.88	(0.64-1.15)	0.4 ns
	R	1.3 \pm 0.3	0.39	(0.17-0.59)	

* : Le thiodicarbe et le méthoxyfénozide ont été testés par ingestion et les autres produits par application topique

2.7.1. Le DDT

La souche BK99R9 ne s'est pas révélée résistante au DDT pourtant la faible valeur de la pente de

la souche résistante pourrait suggérer une résistance (tab. 3). Cette molécule a été utilisée pendant plus de 20 ans en Afrique de l'Ouest d'abord seule puis en association avec de l'endrine, de l'endosulfan et/ou du méthyl-parathion pour contrôler les infestations de *H. armigera*. Avec la découverte des pyréthrinoides, le DDT toujours efficace, a été remplacé au début des années 1980 et son utilisation a été interdite.

2.7.2. L'endosulfan

La sensibilité de *H. armigera* à l'endosulfan a été suivie plus particulièrement sur les populations collectées à Bouaké, depuis que ce produit est utilisé comme alternative aux pyréthrinoides en début de campagne. Il n'y a pas de résistance à l'endosulfan (tab. 3). Ce cyclodiène a été utilisé dans les années 1970 en mélange avec le DDT et le méthyl-parathion pour améliorer le contrôle des infestations de *H. armigera*. Il a été remplacé par les pyréthrinoides en 1984. Suite aux échecs des traitements au champ et le diagnostic de la résistance aux pyréthrinoides il a été réintroduit en Côte d'Ivoire en 1998 (Ochou *et al*, 1998a). Il semble que son efficacité soit à l'origine de l'absence de résistance croisée avec les pyréthrinoides comme le confirme la stabilité de sa DL_{50} sur les populations de *H. armigera* collectées à Bouaké en 1999, 2000 et 2001 (fig. 5).

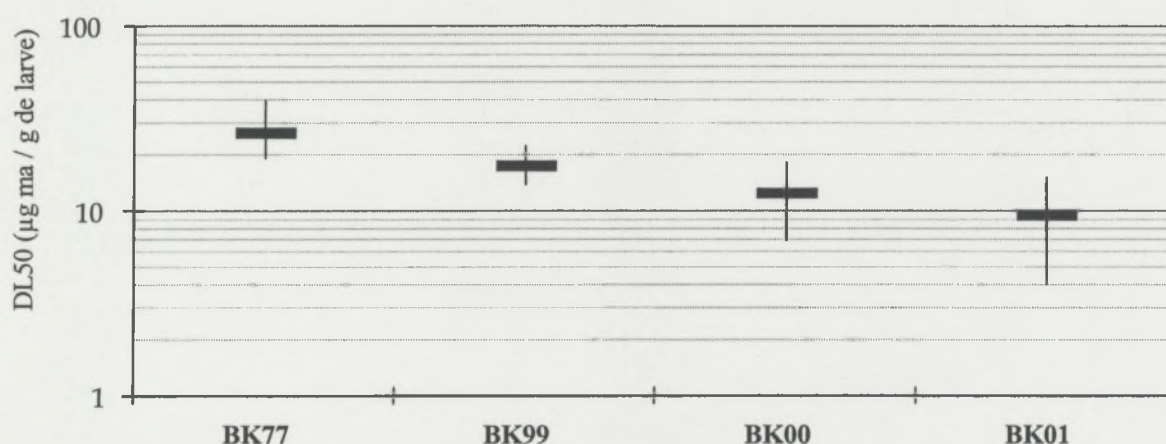


Figure 5 : Réponse à l'endosulfan des larves de la souche sensible BK77 et des populations de terrain collectées à Bouaké de 1999 à 2001 (BK99, BK00 et BK01).

2.7.3. Les organophosphorés

Les organophosphorés sont utilisés en culture cotonnière pour contrôler d'une part les insectes piqueurs notamment l'acarien *P. latus*, le puceron *A. gossypii* et la mouche blanche *B. tabaci* et d'autre part les trois espèces de chenilles phyllophages. Leur utilisation en association avec des pyréthrinoides peut accroître la toxicité du mélange sur *H. armigera* (ch. 4). Certains organophosphorés comme le profénofos n'ont pas véritablement montré de résistance croisée (FR=1.4), leur utilisation ne devrait pas avoir d'effet sur la résistance aux pyréthrinoides comme

semble le confirmer la faible DL_{50} des populations de terrain (fig. 6). A ce titre et du fait de son efficacité sur *P. latius* et *D. vultuosi*, le profénofos est utilisé en Côte d'Ivoire comme alternative aux pyréthrinoides et en mosaïque avec l'endosulfan.

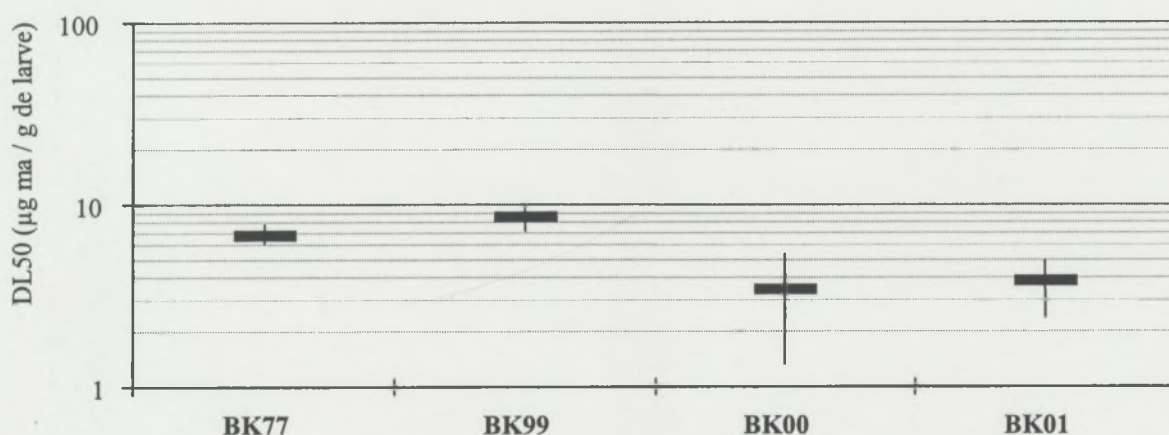


Figure 6 : Réponse au profénofos des larves de la souche sensible BK77 et des populations de terrain collectées à Bouaké de 1999 à 2001 (BK99, BK00 et BK01).

La souche BK99R9 a montré une faible résistance à certains OPs comme l'isoxathion et le chlorpyrifos éthyle (tab. 3). L'utilisation de ces composés doit donc être évitée dans les traitements ciblés sur *H. armigera*.

D'autres encore tels que l'acéphate et le triazophos ont révélé une résistance négative (tab. 3). Cet effet particulièrement intéressant pour gérer la résistance sera étudié plus en détail dans les chapitres suivants.

2.7.3. Les autres familles chimiques

Le thiodicarbe est un carbamate. Il a la particularité d'avoir une activité ovicide et larvicide sur *H. armigera*. Il n'a encore jamais été utilisé en Afrique de l'Ouest et ne présente pas de résistance croisée avec les pyréthrinoides. Cette molécule pourrait être une alternative aux pyréthrinoides.

Le méthoxyfénozide, l'indoxacarb et le spinosad sont des nouvelles molécules qui ne présentent pas de résistance croisée avec la deltaméthrine. Ces trois molécules ont montré leur efficacité au champ pour contrôler les populations de *H. armigera* (Ochou et Martin, 2002 et 2003). Leur faible toxicité sur les mammifères en fait sans doute les meilleures alternatives aux pyréthrinoides, en dépit d'un spectre d'activité plus étroit.

2.8. Discussion

Les bioessais ont montré que le ravageur *H. armigera* est devenu résistant aux pyréthrinoides au milieu des années 1990. L'utilisation des pyréthrinoides a débuté en 1977 et c'est seulement à

partir de 1996 que la résistance aux pyréthrinoides a été décelée chez *H. armigera* en Côte d'Ivoire. Ce délai dans l'apparition de la résistance aux pyréthrinoides peut-être dû à plusieurs facteurs : 1) l'absence probable de résistance croisée avec le DDT qui a la même cible que les pyréthrinoides, 2) la recommandation de doses minimales efficaces avec des produits adaptés, 3) l'utilisation généralisée des mélanges de produits insecticides pour assurer un contrôle des principaux ravageurs du cotonnier, 4) la gestion des insecticides par les sociétés cotonnières suivant les recommandations de la recherche permettant d'assurer la qualité des formulations utilisées, de former et d'informer les agriculteurs sur les bonnes pratiques à suivre.

Le niveau de résistance à la deltaméthrine, prise comme indicateur des pyréthrinoides, est resté modéré et relativement stable en Côte d'Ivoire (FR de 10 à 40) quel que soit l'origine et la plante hôte des populations collectées de 1996 à 2002. A titre de comparaison, les facteurs de résistance à la deltaméthrine des populations de *H. armigera* collectées aux champs en Afrique de l'Ouest en 1997 ont été de 200 au Burkina Faso (non publié) et 250 au Bénin (Djintho *et al.*, en cours).

En Côte d'Ivoire, les variations saisonnières ont révélé un niveau maximal de la résistance en octobre à la fin des traitements coton. D'après Forrester *et al.* (1993) le développement de la résistance de *H. armigera* en Australie se ferait dans les semaines qui suivent les premières utilisations des pyréthrinoides par la pression insecticide exercée sur les adultes. La sélection exercée sur les adultes augmenterait plus rapidement le niveau de résistance que celle effectuée sur les larves. D'après ces mêmes auteurs, elle serait d'autant plus forte qu'elle interviendrait avant que les papillons ne s'accouplent. D'autre part la présence d'individus résistants dans toutes les souches collectées en Côte d'Ivoire semble confirmer l'hypothèse émise par Daly et Gregg (1985) pour les populations australiennes selon laquelle les individus d'une même région forment un pool génétique commun et que la taille effective de la population de *H. armigera* doit être très large.

D'après nos résultats il n'y aurait donc pas eu de pression de sélection pendant l'intercampagne. Pourtant Nibouche (1992) a montré les déplacements de populations de *H. armigera* d'une plante hôte à l'autre, principalement entre le coton (saison des pluies) et la tomate (saison sèche). Or dans les zones cotonnières les cultures de tomate sont traitées de façon intense et généralement avec les insecticides destinés au coton. Mais pendant la période d'étude il semble que les pyréthrinoides n'aient pas été beaucoup appliqués dans les périmètres maraîchers. En effet, par mesure de précaution pour contrôler la résistance, des quantités d'endosulfan supérieures aux besoins ont été acquises par les sociétés cotonnières dont les surplus ont envahi les marchés parallèles. L'endosulfan aurait donc été largement utilisé pour contrôler les infestations de *H.*

armigera sur tomate comme nous l'ont confirmé nos observations de terrain d'où l'absence de sélection d'individus résistants aux pyréthriinoïde.

Le mécanisme de résistance aux pyréthriinoïdes pourrait également avoir un effet sur certains organophosphorés. En effet une résistance de *H. armigera* a été montrée pour le monocrotophos, le chlorpyrifos-éthyle et l'isoxathion mais il se pourrait aussi que cela provienne d'une modification de l'acétylcholinestérase, cible des OP (Javed et Moores, 2003). Ce point sera discuté dans le chapitre 4 (4.3). Par contre l'acéphate et le triazophos seraient plus toxiques sur la souche résistante que sur la souche sensible. Le triazophos, le chlorpyrifos-éthyle et l'isoxathion sont utilisés en Afrique de l'Ouest pour contrôler les acariens et les chenilles phyllophages. Les autres molécules ne sont pas ou plus homologuées du fait de leur inefficacité ou de leur toxicité. Pour éviter de sélectionner des larves résistantes, il serait donc préférable d'éviter l'utilisation du chlorpyrifos-éthyle et de l'isoxathion sur *H. armigera*. Par contre la résistance croisée négative sera étudiée dans le chapitre suivant car ce pourrait être un outil utile pour contrôler la résistance de *H. armigera* aux pyréthriinoïdes.

3. LES MECANISMES DE RESISTANCE AUX PYRETHRINOÏDES

Article 4 : Martin, T., F. Chandre, G. O. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol 74/1 p 17 - 26.

3.1. Introduction

Les pyréthriinoïdes ont pour cible les canaux sodium situés sur les fibres nerveuses. Toute modification structurale diminuant leur affinité avec les insecticides peut induire une résistance. Ce mécanisme d'insensibilité nerveuse ou "knock down resistance" ou *kdr*, a été montré chez les populations de *H. armigera* en Inde, en Australie, en Chine et en Thaïlande (Ahmad *et al.*, 1989 ; Gunning *et al.*, 1991 ; West et McCaffery 1992). Dans chaque cas une résistance croisée entre pyréthriinoïdes et DDT a été observée. En fait, les canaux sodium étant également la cible des organochlorés, le mécanisme *kdr* a d'abord été sélectionné par l'utilisation massive du DDT à partir des années 1950 et a ensuite été re-sélectionné par les pyréthriinoïdes (Gunning 1996). Ce mécanisme, généralement très efficace, peut conférer à *H. armigera* un niveau de résistance très élevé (FR >3000).

D'autres mécanismes liés à l'accroissement des processus de détoxification des pyréthriinoïdes peuvent s'ajouter ou se substituer au mécanisme *kdr*. Cette résistance métabolique résulte d'une

augmentation de la quantité d'enzyme produite ou d'une meilleure efficacité catalytique de l'enzyme. L'hydrolyse des pyréthrinoïdes par les estérases et/ou leur oxydation par les mono-oxygénases à cytochrome P450 (oxydases) sont les principaux mécanismes révélés par les études biochimiques. Mais les glutathion-S-transferases (GST) peuvent aussi être impliquées dans la résistance aux pyréthrinoïdes. En Inde, Kranthi *et al.* (1997) ont montré chez les populations de *H. armigera* résistantes aux pyréthrinoïdes, une plus forte activité des estérases, des oxydases et des GST, par rapport à une souche sensible. Ils ont également observé des variations d'activité enzymatique en fonction de la période de collecte des populations et notamment qu'une forte activité des oxydases coïncidait généralement avec une faible activité des estérases et réciproquement. En Australie, l'augmentation de l'activité des estérases chez les populations de *H. armigera* est devenue le mécanisme majeur de la résistance aux pyréthrinoïdes (Gunning *et al.*, 1996) auquel s'ajoute la réduction de la pénétration des pyréthrinoïdes à travers la cuticule ou *Pen* (Gunning *et al.*, 1995). Le mécanisme *kdr* n'est plus détectable dans les populations de terrain depuis plusieurs années (Gunning, comm. perso.).

Les mécanismes responsables de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les populations de *H. armigera* d'Afrique de l'Ouest ont été identifiés en analysant sur une souche sélectionnée à la deltaméthrine: 1) la toxicité du DDT, 2) l'effet des synergistes indicateurs d'une modification de l'activité enzymatique, 3) la résistance croisée aux autres molécules, 4) les enzymes connues pour leur implication dans la résistance aux pyréthrinoïdes. Le mécanisme de résistance a ensuite été recherché et confirmé chez des souches de terrain collectées à différentes périodes et dans différentes régions de Côte d'Ivoire.

3.2. Des indicateurs du mécanisme de résistance

3.2.1. La résistance croisée au DDT

La résistance croisée entre DDT et pyréthrinoïdes est due à un mécanisme qui réduit la quantité de sites actifs permettant la fermeture des canaux sodium par le DDT comme par les pyréthrinoïdes (Lund et Narahashi, 1983).

Nos études toxicologiques ont montré que la résistance de *H. armigera* à la deltaméthrine ne serait pas croisée avec une résistance au DDT. En effet, la toxicité du DDT sur la souche de *H. armigera* sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 est comparable à celle de la souche de terrain BK01 (fig. 2) malgré leur différence de facteur de résistance à la deltaméthrine (respectivement 189 et 20).

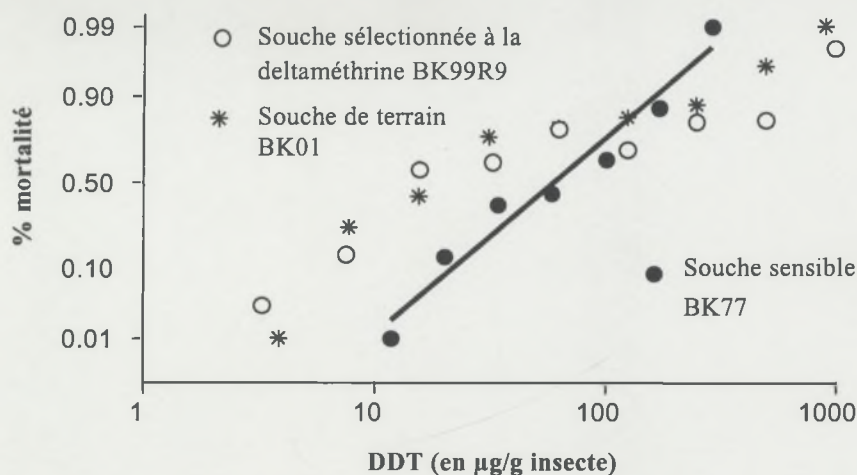


Figure 7 : Réponse au DDT des larves de trois souches de *H. armigera* : une souche de terrain (*), la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 (○) et la souche sensible BK77 (●). La réponse au DDT des populations résistantes aux pyréthriinoïdes n'est pas linéaire indiquant une hétérogénéité de tolérance.

Par contre leurs réponses dose/mortalité diffèrent de la souche de référence BK77 par la valeur des pentes. Ce résultat pourrait s'expliquer par une plus grande homogénéité de la souche BK77 élevée au laboratoire pendant 20 ans et par la présence d'une faible résistance au DDT chez une partie de la population due à un mécanisme particulier (Matsumura, 1983) qui ne serait pas sélectionnée par la deltaméthrine. L'absence de résistance croisée entre deltaméthrine et DDT signifierait que l'utilisation des organochlorés pendant les années 1960s et 1970s ne serait pas à l'origine de la résistance de *H. armigera* aux pyréthriinoïdes.

3.2.2. La résistance croisée aux autres pyréthriinoïdes

J'ai montré au chapitre précédent que la résistance à la deltaméthrine était croisée avec toutes les pyréthriinoïdes testées (2.4, tab. 2). La souche BK99R9 est respectivement 5, 15, 163 et 189 fois plus résistante à l'étofenprox, à la bifenthrine, au fenvalérate et à la deltaméthrine que la souche sensible BK77. De telles différences de structure moléculaire (fig. 8) ne semblent pas empêcher complètement la résistance de s'exprimer ce qui suggère l'implication des oxydases. Cependant le facteur de résistance de l'étofenprox est faible comparé à ceux obtenus pour le fenvalérate et la deltaméthrine. Dans ce cas, l'étofenprox n'étant pas un ester contrairement aux autres pyréthriinoïdes, ce pourrait aussi être un argument en faveur de l'implication des estérases dans le mécanisme de résistance.

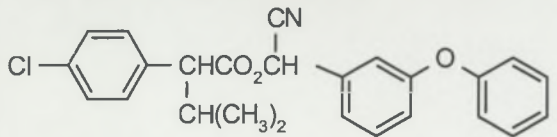
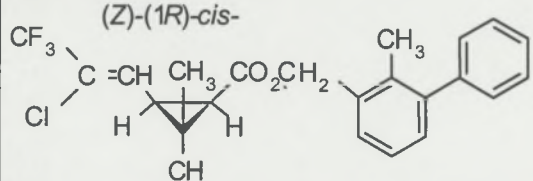
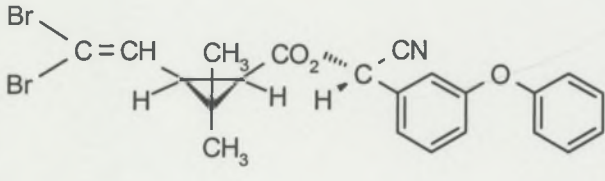
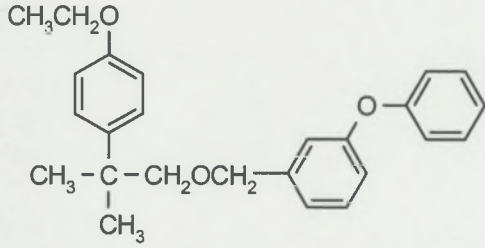
<p>Fenvalérate: ester lié à un phenoxybenzyl alcool et à un acide aromatique</p> 	<p>Bifenthrine: ester lié à un biphenyl alcool méthylé et un acide aromatique</p> <p>(Z)-(1R)-cis-</p> 
<p>Deltaméthrine: ester lié à un phenoxybenzyl alcool et à un acide aliphatique</p> 	<p>Étofenprox: non ester lié à un phenoxybenzyl alcool</p> 

Figure 8 : Principaux types de structures moléculaires des pyréthrinoides: fenvalérate, deltaméthrine, bifenthrine et étofenprox.

3.2.3. Les synergistes

Les synergistes pipéronyl butoxide (PBO) et S,S,S tributyl phosphoro trithioate (DEF) ont été utilisés en bioessais à des doses non toxiques comme inhibiteurs potentiels des enzymes impliqués dans la dégradation des pyréthrinoides. Les résultats des bioessais de la deltaméthrine appliquée avec et sans PBO ou DEF sur la souche sensible BK77 et trois souches de terrain, sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : DL₅₀ et facteur de résistance (FR) pour la deltaméthrine avec et sans PBO ou DEF sur les souches de *H. armigera* sensible et résistantes

Souche ^a	DL ₅₀ en µg/g larve (Facteur de résistance ^b)		
	Deltaméthrine seule	Deltaméthrine + PBO	Deltaméthrine + DEF
BK77 (S)	0.049	0.045	0.045
BK99R9 (R)	10.40 (189)	0.192 (4)	-
BK96 lab	2.26 (46)	0.229 (5)	0.320 (7)
BK97	1.33 (27)	0.430 (10)	0.860 (19)
NBG97	0.89 (18)	0.047 (1)	-

^a S pour la souche sensible BK77 et R pour la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 ; les souches BK96 lab, BK97 et NBG97 ont été collectées à Bouaké et Nambingué en 1996 et 1997; ^b Facteur de résistance (FR) calculé par le rapport DL₅₀ souche résistante / DL₅₀ souche sensible.

Le pré-traitement avec le PBO n'a pas d'effet sur la toxicité de la deltaméthrine appliquée sur la souche sensible, mais il supprime pratiquement la résistance de la souche résistante BK99R9. Le facteur de résistance à la deltaméthrine décroît de 189 à 4. La quasi suppression de la résistance par le PBO a également été observé sur les souches BK96lab et NBG97. Le DEF n'a pas pu être testé sur toutes les souches mais il a diminué significativement la résistance de la souche BK97 et

plus particulièrement de la souche BK96lab.

Ces résultats indiquent une modification de l'activité enzymatique de nos souches résistantes de *H. armigera*. Le PBO étant un inhibiteur d'oxydases, son effet synergique avec un pyréthrianoïde est généralement considéré comme indicateur d'un mécanisme lié à une augmentation de la dégradation des pyréthrianoïdes par les oxydases (Lee *et al.*, 1989 ; Clarke *et al.*, 1990). Mais ce n'est pas toujours le cas (Kennaugh *et al.*, 1993 et Gunning 1998). En Australie, plus de 70% de l'activité des estérases liée à la résistance de *H. armigera* aux pyréthrianoïdes est inhibée en présence de PBO (Gunning *et al.*, 1998). L'effet synergique du phosphate DEF sur les pyréthrianoïdes à l'instar du profénofos est généralement considéré comme un indicateur de l'inhibition des estérases (Graves *et al.*, 1991 ; Gunning *et al.*, 1999).

3.3. La dégradation enzymatique

3.3.1. Les oxydases

L'introduction par les oxydases d'un ou plusieurs atomes d'oxygène dans une molécule organique revient généralement à la rendre plus hydrophile et plus soluble, ce qui va faciliter son élimination. Pour mesurer la quantité de cytochrome P-450 ou leur activité chez les insectes les méthodes classiques préconisent de travailler à l'aide de substrats chromogènes sur les fractions microsomales d'un grand nombre d'insectes (Omura and Sato, 1964 ; Mayer *et al.*, 1977 ; Feyereisen 1983 ; Feyereisen et Vincent 1984 ; Patil *et al.*, 1990). Une autre méthode consiste à mesurer la quantité de dieldrine produite par époxydation de l'aldrine (Rose et Wallbank, 1986). Mais travailler sur les microsomes nécessite un matériel lourd (ultracentrifugation) et un grand nombre d'individus de chaque population sensible et résistante avec un niveau de résistance élevé.

Une méthode alternative a été utilisée par Brogdon *et al.* (1997) sur les moustiques. Elle consiste à faire agir les oxydases de l'insecte sur le peroxide d'hydrogène (H_2O_2) en présence de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMBZ). Pendant la réaction, l' O_2 est libéré et oxyde le TMBZ pour donner un produit final coloré. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la concentration de l'enzyme. Elle se mesure par photométrie à 630 nm. Par cette méthode, la concentration en oxydases de chaque individu d'une population d'insectes peut être obtenue très rapidement à l'aide d'un lecteur de microplaques.

La souche BK99R9 a une concentration moyenne d'oxydases de 3.8 fois supérieure à celle de la souche sensible BK77 (tab. 5). Une augmentation de cette concentration moyenne d'oxydases a été observée chez les générations successives de la souche résistante de *H. armigera* sélectionnée à

la deltaméthrine (BK99R) suggérant que la dégradation par les oxydases puisse être le mécanisme principal de la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoides.

Tableau 5 : Concentration en oxydases et activité moyenne des estérases et glutathion-S-transférase des souches de *H. armigera*, sensible (BK77) et résistante aux pyréthroids (BK99R).

Souches	N ^a	estérase ^b (α NA) en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine	estérase ^c (PNPA) en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine	oxydase en nmol equiv. cyt-P450 /mg protéine	GST ^d en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine
BK77	40	0.161	0.183	3.224	0.202
BK99R4	23	0.120	0.167	10.734*	0.365*
BK99R9	40	0.074*	0.131*	12.352*	0.554*
BK99R10	46	0.050*	0.113*	5.355*	0.198
BK99R11	23	-	0.198	14.734*	0.268*
BK99R13	25	-	0.246*	20.853*	0.150

^a N : nombre de larve testée ; ^b activité des estérases obtenue avec l'alpha naphthyl acétate ; ^c activité des estérases obtenue avec le para-nitrophenyl acétate ; ^d GST : activité des glutathion-S-transférases ; * : indique une différence significative avec la souche sensible ($P < 0.05$ avec un test de Mann-Whitney).

Le diagramme de fréquence (fig. 9) révèle une quantité faible et homogène pour les individus de la souche sensible BK77 ne dépassant pas 10 nmole/mg de protéine et une quantité généralement plus forte pour les individus de la souche résistante BK99R9.

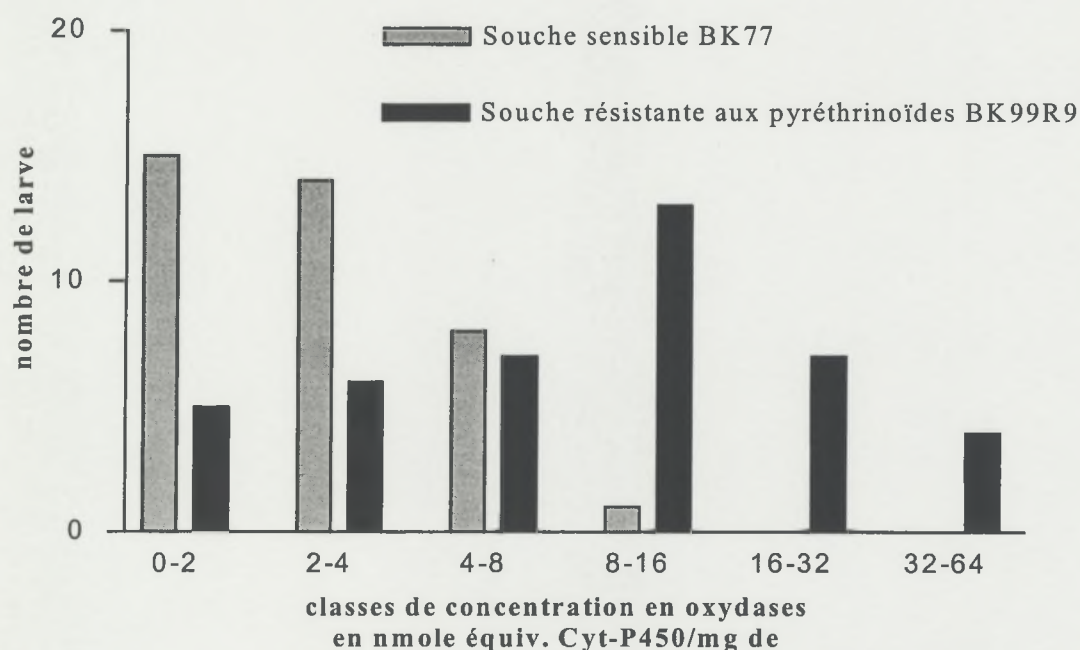


Figure 9 : Diagramme de distribution de fréquence de la concentration en oxydases (en nmole équiv. Cyt-P450/mg de protéine) dans les larves de *H. armigera* sensible (BK77) et résistantes aux pyréthrinoides (BK99R9). Pour chaque souche, $n = 40$.

On remarque également que la souche résistante BK99R9 reste très hétérogène. Environ 25% des individus qui la composent ont une quantité d'oxydases inférieure à 10 nmol/mg protéine ce qui pourrait suggérer la présence d'individus sensibles ou l'existence d'un mécanisme secondaire.

Cette technique pourrait permettre de déterminer rapidement la fréquence de ce mécanisme de résistance dans une population. Les résultats des tests enzymatiques révèlent aussi un niveau d'oxydases particulièrement élevé pour les générations suivantes BK99R11 mais surtout BK99R13 dont le facteur de résistance à la deltaméthrine est supérieur à 1000. Pour cette dernière souche l'activité des estérases est significativement supérieure à celle de la souche sensible ce qui pourrait suggérer la sélection d'un nouveau mécanisme de résistance. Ces données montrent le potentiel d'évolution de ce type de résistance.

3.3.2. Les glutathion-S-transférases

L'activité des GST de la souche résistante BK99R9 est significativement plus élevée (2.7 fois) que celle de la souche sensible BK77 (Tab. 5). Cependant cette différence n'a pas été retrouvée chez les générations suivantes toujours sélectionnées à la deltaméthrine.

3.3.2. Les estérases

L'activité des estérases a été mesurée en utilisant deux substrats différents : l'alpha-naphtyl acétate (α -NA) et le para-nitrophényl acétate. Le substrat α -NA a été utilisé avec succès pour mettre en évidence la résistance aux pyréthrinoïdes par l'augmentation de l'activité des estérases chez *H. armigera* en Australie (Gunning *et al.*, 1995) et *H. virescens* aux USA (Goh *et al.*, 1995). Sur notre souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9, les valeurs d'activité moyenne des estérases sont significativement plus faibles que celles de la souche sensible BK77 quelque soit le substrat utilisé. Le même résultat a été observé chez la souche BK99R10 mais pas dans les générations sélectionnées suivantes BK99R11 et BK99R13.

3.4. Le suivi du mécanisme de résistance chez les populations de terrain

Les premières générations des populations de terrain de *H. armigera* collectées de 1998 à 2001 sur différentes plantes hôtes ont été soumises à une dose discriminante de deltaméthrine (0.6 μ g/g larve). Les pourcentages de larves résistantes varient de 15% à 77% contre 89% chez la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9. Des tests biochimiques ont aussi été effectués sur les premières larves issues de ces populations. La quantité moyenne d'oxydases varie de 2.3 à 8.9 nmole/mg protéine pour les populations de terrain comparé à 2.1 nmole/mg protéine pour la souche sensible BK77 (tab. 6). Chez seulement cinq de ces populations, la concentration moyenne d'oxydases mesurée est significativement plus élevée. Seule la souche KDG98/10c a une activité moyenne des GST significativement supérieure à celle de la souche sensible (tab. 6). La souche du Mali KDG98/10c collectée sur coton en décembre 1998 présente les mêmes caractéristiques que les souches de Côte d'Ivoire notamment une plus forte quantité d'oxydases que la souche sensible BK77. Quant à la souche du Burkina Faso FKB01/08c collectée en

août 2001 sur coton, son faible niveau de résistance n'a pas permis de mettre en évidence son mécanisme.

Tableau 6 : Pourcentages de larves résistantes, activité des estérases, concentration en oxydases et activité des glutathion-S-transférases des populations de *H. armigera* collectées sur différentes plantes hôtes de 1998 à 2001

souches ^a	% larves résistantes ^b ± e.s.	estérases ^c (αNA)	estérases ^c (PNPA)	oxydases ^d	GST ^c
BK77	1 % ± 0.01	0.161	0.183	3.224	0.202
KDG98/10c	69 % ± 0.06	0.140	0.162	5.124*	0.278*
BK99/03t	58 % ± 0.06	0.123	0.155	6.536*	0.184
BK99/04g	-	0.103	0.174	4.861*	0.170
KHO99/06g	52 % ± 0.07	0.111	0.017	8.950*	0.173
BF99/9c	-	0.055	0.091	2.356*	0.142
MB99/9c	-	0.058	0.113	1.656	0.133
BK99/10c	77 % ± 0.05	0.064	0.117	3.770	0.105
KHO99/10c	55 % ± 0.06	0.135	0.029	3.796	0.131
NIO99/10c	-	0.111	0.015	1.191	0.104
BK00/04t	-	0.146	0.159	3.975	0.094
BK00/10c	49 % ± 0.07	0.070	0.055	2.775	0.103
MK00/10c	31 % ± 0.06	0.108	0.096	5.875*	0.200
FKB01/08c	19 % ± 0.05	0.017	0.065	2.150	0.107
BOU01/10c	15 % ± 0.05	0.053	0.126	2.150	0.221
BK01/10c	54 % ± 0.06	0.033	0.136	3.075	0.128

^a souches collectées à différentes périodes de l'année (année/mois) sur coton (c), tomate (t) or gombo (g): BK77 : souche sensible ; KDG : Konodougou, Mali; BK : Bouaké, CI; KHO : Korogho, CI; BF : Bouaflé, CI; MB : M'Bengué, CI; NIO : Niofoin, CI; MK : Mankono, CI; FKB : Farakoba, Burkina Faso; BOU : Boundiali, CI; ^b dose discriminante de deltaméthrine (0.6 µg/g larva); ^c activités des esterase et glutathione-S-transferase est exprimée en µmol/min/mg protéine ; ^d concentration d'oxydases est exprimée en nmole/mg protéine ; * : indique une différence significative avec la souche sensible BK77 avec P < 0.05 (test de Mann-Whitney). Pour les test biochimiques n=25.

3.5. La répartition de la résistance dans une population de terrain

En 2002, une étude a été conduite pour connaître la répartition des larves résistantes dans la première génération des populations de terrain pour expliquer la faible corrélation entre le taux de larves résistantes et la quantité d'oxydases observée précédemment (cf. 3.4.1). Des bioessais et des tests biochimiques ont été réalisés sur les larves issues des pontes successives de trois populations de *H. armigera* collectées sur mufler en février, avril et mai 2002 (tab. 7). Le pourcentage de larves résistantes des trois populations varie entre 42% et 53% suggérant un niveau de résistance modéré. Les tests enzymatiques montrent chez ces mêmes populations une quantité moyenne d'oxydases significativement supérieure à celle de la souche sensible BK77. On retrouve également pour les trois populations, une activité des estérases significativement plus faible que chez la souche sensible. Par contre aucune différence n'est apparue concernant les GST.

Tableau 7 : Pourcentages de larves résistantes de *H. armigera*, activité des estérases, concentration en oxydases et activité des glutathion-S-transférases des populations de terrain collectées en février, avril et mai 2002

souches ^a	% larves résistantes ^b ± e.s.	n	estérases ^c	oxydases ^d	GST ^c
BK77	1 % ± 0.01	46	0.231	2.640	0.202
BK02/02f	53 % ± 0.4	69	0.111*	5.544*	0.167
BK02/04f	42 % ± 0.3	192	0.137*	4.959*	0.129
BK02/05f	42 % ± 0.4	97	0.095*	8.593*	0.114

^a souches collectées à différentes périodes de l'année (année/mois) sur fleur de mufler (f), BK77: souche sensible; ^b dose discriminante de deltaméthrine (0.6 µg/g larve); ^c activités des estérases et glutathion-S-transférase est exprimée en µmol/min/mg protéine ; ^d concentration d'oxydases est exprimée en nmole/mg protéine ; *: indique une différence significative avec la souche sensible BK77 avec P < 0.05 (test de Mann-Whitney).

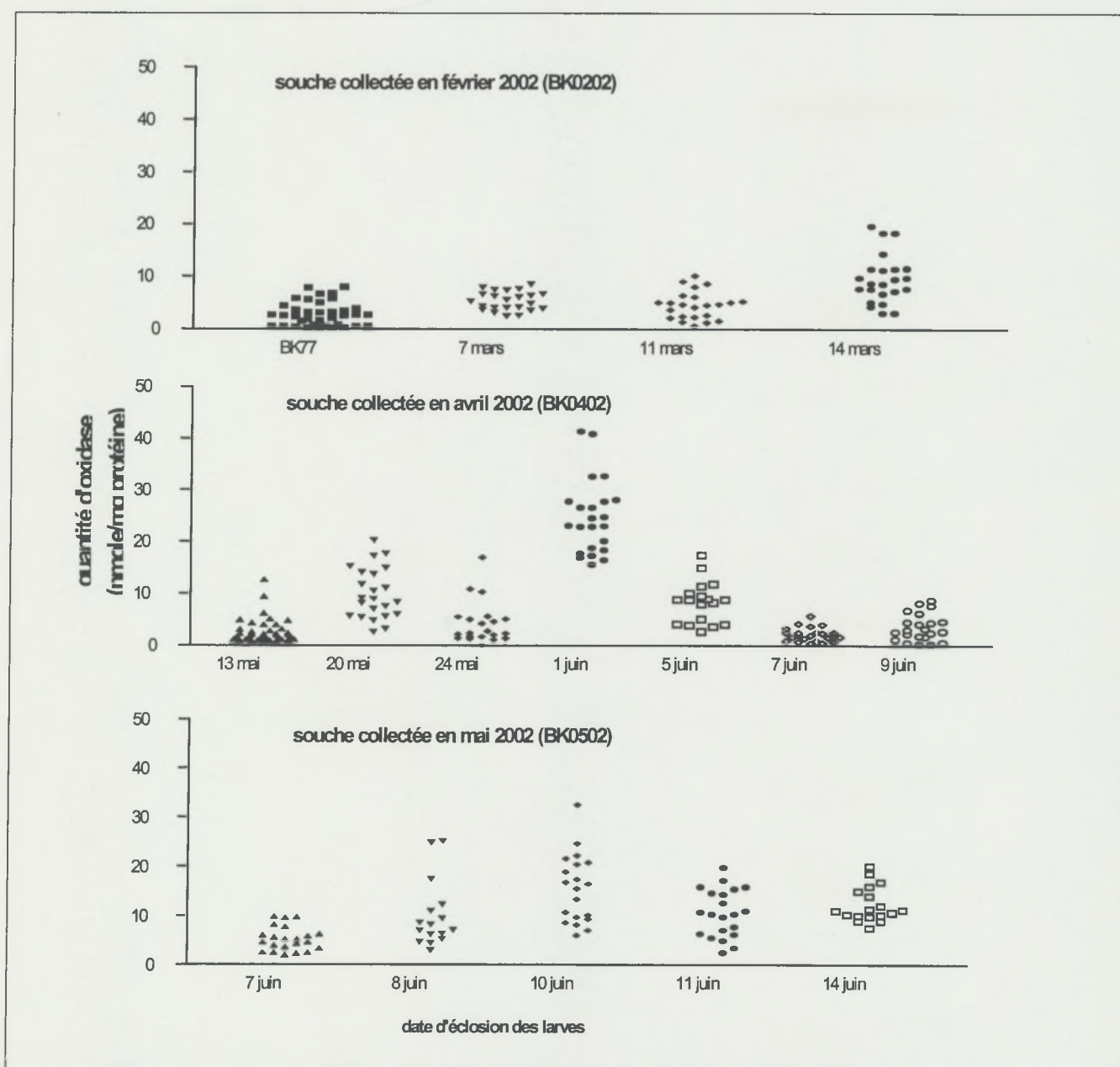


Figure 10 : Quantité individuelle d'oxydases des larves issues des pontes successives de la 1^{ère} génération des populations de *H. armigera* collectées en février, avril et mai 2002 (BK0202, BK0204 et BK0205).

Contrairement aux populations testées précédemment dont les larves testées étaient issues des premières pontes, les tests ont été effectués sur des larves provenant de toutes les pontes. Pour les populations BK0202, BK0204 et BK0205, la répartition des individus des pontes successives en fonction de leur quantité d'oxydases est présentée dans la figure 10. La figure illustre clairement l'hétérogénéité intra et inter ponte. Il semble aussi que les larves ayant les plus fortes quantités d'oxydases n'apparaissent pas dès la première ponte. D'où la nécessité de prendre des larves issues des pontes successives pour caractériser la résistance dans les populations de terrain aussi bien pour les bioessais que pour les tests biochimiques.

3.8. Discussion

D'après les résultats de mes travaux il semblerait que la résistance aux pyréthrinoides des populations de *H. armigera* de Côte d'Ivoire soit due à une augmentation du métabolisme du à une surproduction d'oxydases. D'une part la résistance est quasiment supprimée par le synergiste PBO et d'autre part, la concentration en oxydases est plus importante chez les insectes résistants que chez les sensibles.

L'analyse de la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 montre une concentration plus élevée en oxydases et une plus faible activité des estérases comparativement à la souche sensible BK77. Une faible augmentation de l'activité des GST a aussi été observée chez BK99R9 pouvant indiquer un mécanisme secondaire potentiel. En Inde, Kranthi *et al.* (1997) ont observé chez *H. armigera* qu'une augmentation d'oxydases correspondait à une diminution d'estérases et réciproquement. L'analyse des populations de terrain collectées de 1998 à 2002 semble confirmer l'augmentation de la concentration en oxydases comme mécanisme de résistance principal. L'importance de l'attaque oxydative dans la résistance aux pyréthrinoides a déjà été montrée chez *H. armigera* en Inde (Kranthi *et al.*, 1997) et en Chine (Dong *et al.*, 1999) et chez *Heliothis virescens* aux Etats Unis (Ottea *et al.*, 1995, Ibrahim et Ottea, 1995, Zhao *et al.*, 1996).

Les tests toxicologiques n'ont pas montré de résistance croisée positive entre le DDT et la deltaméthrine chez *H. armigera* confirmant les résultats des précédents bioessais effectués sur des souches de Côte d'Ivoire (Alaux, 1994). Le mécanisme *kdr* ne serait donc pas impliqué dans la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoides en Afrique de l'Ouest et cette résistance ne serait pas due à l'utilisation préalable des organochlorés comme ça a été le cas vraisemblablement en Asie et en Australie (Gunning *et al.*, 1990). Cependant une petite partie de la population pourrait présenter une faible résistance au DDT comme le laisserait supposer les faibles valeurs de pentes des droites de régression dose/mortalité. Cette hypothèse pourrait être confirmée ultérieurement

par des mesures neurophysiologiques ou par la recherche des gènes *kdr* (Head, 1998).

Le rôle majeur des oxydases dans le mécanisme de résistance est indirectement suggéré par la résistance croisée avec tous les pyréthrinoïdes testées. Ces différentes molécules ont toutes des sites d'oxydation sur leurs parties alcool et acide (Lee *et al.*, 1989). L'implication des oxydases peut aussi expliquer la résistance croisée positive ou négative observée avec certains organophosphorés chez la souche sélectionnée à la deltaméthrine comparativement à la souche sensible (cf. 2.6). En effet, des oxydases sont aussi impliquées dans l'activation et/ou la détoxification des organophosphorés (Champ, 1985 ; Sabourault *et al.*, 2001). Autrement dit, les mêmes oxydases responsables de la dégradation des pyréthrinoïdes chez les larves résistantes de *H. armigera* pourraient avoir un effet sur certains organophosphorés soit en augmentant soit en diminuant leur toxicité. Ce phénomène sera étudié dans les chapitres suivants.

D'autres mécanismes de résistance aux pyréthrinoïdes peuvent exister également : une augmentation de l'activité des GST, dont l'activité s'est révélée significativement plus élevée chez la souche BK99R9 mais aussi une modification de l'activité des estérases. Plusieurs indices peuvent suggérer l'implication de ces dernières : 1) Le DEF, inhibiteur d'estérases, a montré qu'il pouvait parfois supprimer une partie de la résistance ; 2) Le PBO qui supprime quasiment la résistance peut aussi être un inhibiteur d'estérases (Gunning, 1998) ; 3) Une faible résistance croisée a été observée avec l'étofenprox qui n'est pas un ester contrairement aux autres pyréthrinoïdes, un facteur de résistance de 5 pouvant être considéré comme négligeable comparé à ceux obtenus avec la deltaméthrine ou le fenvalérate et s'expliquer par une simple différence de fitness entre les souches ; 4) La variabilité de l'activité des estérases dans les souches résistantes suggère que les estérases puissent agir différemment par rapport à celles de la souche sensible, soit qu'elles ne réagiraient pas avec les substrats chromogènes utilisés habituellement sur *H. armigera* et *H. virescens* (Kranthi *et al.*, 1997, Gunning *et al.*, 1996 et Zhao *et al.*, 1996), soit que leur efficacité catalytique ait été modifiée, soit qu'elles auraient une action sur la régulation des gènes d'oxydases à l'instar du modèle proposé par Sabourault *et al.* (2001) chez la mouche domestique résistante aux insecticides. Cependant je n'ai pas trouvé de corrélation entre l'activité des estérases ou des GST et la résistance des populations sélectionnées à la deltaméthrine ou collectées sur le terrain ce qui voudrait dire que si ces mécanismes enzymatiques existent ils ne seraient pas très répandus.

En conclusion, l'implication des oxydases dans le mécanisme de résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes est probable mais elle n'exclue pas pour autant celle des estérases et des GST. Des études ultérieures sur l'activité d'enzymes purifiées, l'identification des gènes d'oxydases

surexprimés et l'identification des mécanismes de résistance de populations collectées dans d'autres régions d'Afrique de l'Ouest permettront de confirmer ces résultats. La capacité de diagnostiquer la nature précise du mécanisme de résistance est primordiale pour la gestion de la résistance. La méthode biochimique utilisée pour mettre en évidence la surexpression des oxydases dans le mécanisme de résistance est facilement transférable et peu coûteuse. Elle pourrait être utilisée en routine pour suivre l'évolution de la résistance en complément des tests toxicologiques.

La conservation de l'efficacité des pyréthrinoïdes sur une plus longue période est un challenge pour tous les pays d'Afrique en raison de l'importance de ce ravageur. Les alternatives chimiques sont peu nombreuses, elles ont un spectre d'activité plus étroit et leur coût est encore élevé. L'implication probable des oxydases dans le mécanisme de résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes devrait permettre de trouver des molécules susceptibles de contrer l'effet de ces enzymes notamment dans la famille des organophosphorés. Les thiophosphates étant activés par des oxydases pour avoir une action neurotoxique sur les insectes, l'augmentation de la quantité d'oxydases chez *H. armigera* résistant peut avoir deux conséquences : accélérer la dégradation des pyréthrinoïdes et accroître l'activation de ces thiophosphates.

4. LES SYNERGIES DES MELANGES PYRETHRINOÏDES PLUS ORGANOPHOSPHORES

Article 5 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Organophosphorus insecticides synergise pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *J. Econ. Entomol.*, 96, 2, 469-474.

4.1. Introduction

Des études toxicologiques réalisées sur des souches sensibles de *H. armigera* d'Afrique de l'Ouest, ont montré que certaines associations pyréthrinoïde plus organosphosphoré (OP) pouvaient être synergisantes (Vaissayre et Lucas-Chauvelon 1989, Goebel et Jacquemard 1990, Martin et Jacquemard 1991). Autrement dit, la toxicité du mélange se révélait supérieure à la somme des toxicités des produits appliqués seuls. Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres espèces d'héliothinae comme *Heliothis zea* (Boddie) and *H. virescens* (F.) (All *et al.*, 1977).

Après l'acquisition de la résistance aux pyréthrinoïdes, le synergisme entre pyréthrinoïde et OP a été montré pour certains mélanges chez *H. virescens* aux U.S.A. (Campanhola et Plapp, 1989) dont le mécanisme de résistance métabolique est due à une augmentation de l'activité des oxydases (Zhao *et al.*, 1996) et chez *H. armigera* en Australie (Forrester *et al.*, 1993) dont la résistance

métabolique est due à une augmentation de l'activité des estérases (Gunning *et al.*, 1999). D'autre part, les travaux conduits par Alaux (1994) sur une souche de *H. armigera* d'origine thaïlandaise résistante aux pyréthrinoïdes, ont montré qu'une pression de sélection avec un mélange deltaméthrine plus triazophos retardait considérablement le développement de la résistance à la deltaméthrine contrairement à l'application de deltaméthrine seule.

Pour augmenter la toxicité des pyréthrinoïdes sur les populations résistantes de *H. armigera* j'ai donc recherché des OP capables de synergiser les pyréthrinoïdes. Plusieurs combinaisons ont été testées sur des souches, sensible BK77 et résistantes (BK99R3 et BK99R5), aux ratios déjà utilisés en culture cotonnière. L'association deltaméthrine plus triazophos s'étant révélée particulièrement synergisante, j'ai recherché une explication de la synergie à travers l'étude toxicologique d'un mélange avec des doses non toxiques de triazophos.

4.2. La méthode d'analyse

Les interactions entre xénobiotiques (médicaments, pesticides...) peuvent être calculées suivant plusieurs méthodes (Loewe 1957; Sun et Johnson, 1960; Webb 1963; Plackett et Hewlett 1967; Finney 1971; Koziol et Witkowski, 1982; Robertson et Smith, 1984; Chou et Talalay 1984). La méthode des index de combinaison de Chou et Talalay (1984) m'a semblée la plus appropriée. Elle est basée sur l'effet dose de chaque produit utilisé seul et en mélange. L'index de combinaison (IC) servant à quantifier l'interaction est calculé pour toute mortalité x suivant l'équation :

$$IC_x = \frac{DL_x^{py(m)}}{DL_x^{py}} + \frac{DL_x^{op(m)}}{DL_x^{op}} + \frac{DL_x^{py(m)}}{DL_x^{py}} \frac{DL_x^{op(m)}}{DL_x^{op}} \quad \text{Equation 1}$$

où $DL_x^{py(m)}$ et $DL_x^{op(m)}$ sont les doses du pyréthrinoïde py et de l'OP op utilisées dans le mélange m entraînant la mortalité x ; DL_x^{py} et DL_x^{op} sont les doses léthales du pyréthrinoïde py et de l'OP op requises pour entraîner la même mortalité x lorsqu'il sont utilisés seuls. Quand les deux insecticides ont un effet additif, la valeur de l'index de combinaison $IC=1$. Quand les deux insecticides ont un effet synergique, la dose léthale est inférieure à celle qui est attendue, $IC < 1$. Quand les deux insecticides ont un effet antagoniste, la dose léthale est supérieure à celle qui est attendue, $IC > 1$.

La toxicité d'un mélange est la somme des toxicités intrinsèques de chaque insecticide ($\%M_{py}$ pour le pyréthrinoïde et $\%M_{op}$ pour l'OP) plus celle de l'effet synergique. La toxicité intrinsèque est calculée en utilisant la relation dose mortalité obtenue pour chaque insecticide utilisé seul. La toxicité due au synergisme est estimée comme suit : $\%M_{(py+op)} = 100 - (\%M_{py} + \%M_{op})$.

4.3. Les insecticides seuls

Les résultats des bioessais avec les pyréthrinoïdes et les OPs seuls (tab. 8 et 9) ont été présentés précédemment (cf 2.7.3). Certains OP comme le chlorpyrifos montrent une faible résistance croisée positive (FR=3.2). D'autres comme l'éthion et le profénofos ne montrent pas de résistance croisée. Le triazophos quant à lui montre une résistance croisée négative (FR=0.3) mais pas sa forme active oxydée ou forme oxon (tab. 8). Il est possible que les mêmes oxydases surexprimées dans les larves résistantes puissent accroître la dégradation des pyréthrinoïdes et, selon la structure des molécules organophosphorées, entraîner leur activation (ex : triazophos) et/ou leur dégradation (ex : chlorpyrifos). Une autre explication pourrait être que la souche de référence BK77 ainsi que les souches de terrain seraient déjà résistantes à certains OPs, via une modification de leur cible l'acétylcholinestérase (AChE), à l'instar de la souche de référence Oxford considérée « sensible » originaire d'Afrique du Sud (Javed et Moores, 2003). Cependant je n'ai pas trouvé de différence d'activité entre les AChE des souches sensible et résistante. Les quantités d'AChE et les vitesses d'inhibition étaient identiques (données non publiées).

4.4. Les mélanges synergisant

4.4.1. La toxicité des mélanges

Chez la souche sensible BK77, la toxicité de certains mélanges pyréthrinoïde plus OP, basée sur leurs DL_{50} et DL_{90} , est significativement plus élevée que la toxicité attendue (tab. 9). Cet effet a été observé avec les mélanges cyperméthrine / éthion, cyperméthrine / profénofos, deltaméthrine / triazophos et bétacyfluthrine / chlorpyrifos. Mais il n'a pas été observé avec d'autres mélanges tels que deltaméthrine / chlorpyrifos et cyfluthrine / chlorpyrifos.

Dans les souches résistantes, l'addition d'un OP augmente significativement la toxicité du pyréthrinoïde auquel il est associé, supprimant une bonne partie de la résistance (tab. 9). La plus forte augmentation de toxicité a été obtenue avec la deltaméthrine pour laquelle la DL_{50} est passée de 10.40 $\mu\text{g/g}$ seule à 0.450 $\mu\text{g/g}$ en mélange avec le triazophos et à 0.682 $\mu\text{g/g}$ en mélange avec le chlorpyrifos. L'effet le plus faible a été observé avec la cyperméthrine dont la DL_{50} est passée de 3.657 $\mu\text{g/g}$ seule à 0.435 $\mu\text{g/g}$ en mélange avec l'éthion et à 0.535 $\mu\text{g/g}$ en mélange avec le profénofos. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau de la DL_{90} (tab. 9). Cependant la résistance n'a jamais été totalement supprimée comme le montrent les facteurs de résistance des mélanges qui varient de 6 à 26.

4.4.2. Les interactions entre pyréthriinoïde et organophosphoré

Pour estimer les interactions en termes de synergie ou d'antagonisme, les index de combinaison (IC) ont été calculés pour chaque mélange (tab. 10). De même pour chaque produit utilisé seul ou en mélange, les pourcentages de mortalité ont été calculés au niveau des DL_{50} et des DL_{90} .

Chez la souche sensible BK77, quand la cyperméthrine et l'éthion sont mélangés au ratio 1:10, l' IC_{50} (0.31) est significativement inférieur à 1 indiquant un synergisme (tab. 10). Au niveau de la DL_{50} du mélange, la toxicité des produits utilisés seuls est de 6.6% pour la cyperméthrine et de 0% pour l'éthion (l'éthion n'étant pas toxique à la dose de $0.77 \mu\text{g/g}$). Ainsi, l'effet synergique du mélange est responsable de 93.4% de la mortalité observée. Un effet synergique similaire est observé au niveau de la DL_{90} mais la mortalité due à l'effet synergique n'est plus que de 27.3%. Les IC significativement inférieurs à 1 ont montré un effet synergique pour les mélanges cyperméthrine / profénofos, deltaméthrine / triazophos, bétacyfluthrine / chlorpyrifos (tab. 10). Par contre, des IC non significativement différents de 1 n'ont montré qu'un effet additif pour les mélanges deltaméthrine / chlorpyrifos et cyfluthrine / chlorpyrifos.

Sur les souches de *H. armigera* résistantes aux pyréthriinoïdes, les IC_{50} et IC_{90} significativement inférieurs à 1 ont révélé un synergisme pour les mélanges cyperméthrine / éthion, deltaméthrine / triazophos et deltaméthrine / chlorpyrifos (tab. 10). Par contre des IC non significativement différents de 1 n'ont montré qu'un effet additif pour les mélanges cyperméthrine / profénofos, cyfluthrine / chlorpyrifos et bétacyfluthrine / chlorpyrifos.

L'effet synergique d'un mélange pyréthriinoïde + OP est donc apparu chez les souches sensibles BK77 et résistantes (BK99R3 et BK99R5) mais pas forcément pour les mêmes combinaisons. Ainsi le mélange cyperméthrine / profénofos a eu un effet synergique sur la souche sensible BK77 mais qu'un effet additif sur la souche résistante BK99R3. Par contre, le mélange deltaméthrine / chlorpyrifos a montré un effet additif sur la souche sensible mais un effet synergique sur la souche résistante BK99R5. Quant à l'éthion il s'est révélé meilleur synergiste de la cyperméthrine sur la souche résistante que sur la souche sensible. J'ai tenté d'expliquer ce phénomène à travers l'étude toxicologique comparée des mélanges deltaméthrine / triazophos et deltaméthrine / triazophos oxon.

4.5. L'effet synergique du mélange deltaméthrine plus triazophos

La toxicité de la deltaméthrine en mélange avec le triazophos ou sa forme active, le triazophos oxon (fig. 11) a été comparée à celle de la deltaméthrine utilisée seule (tab. 11). J'ai choisi un ratio 1:1 pour limiter l'effet toxique du triazophos et de sa forme oxon aux doses utilisées dans les

mélanges (0.14 et 0.009 $\mu\text{g/g}$ respectivement à la DL_{90} du mélange).

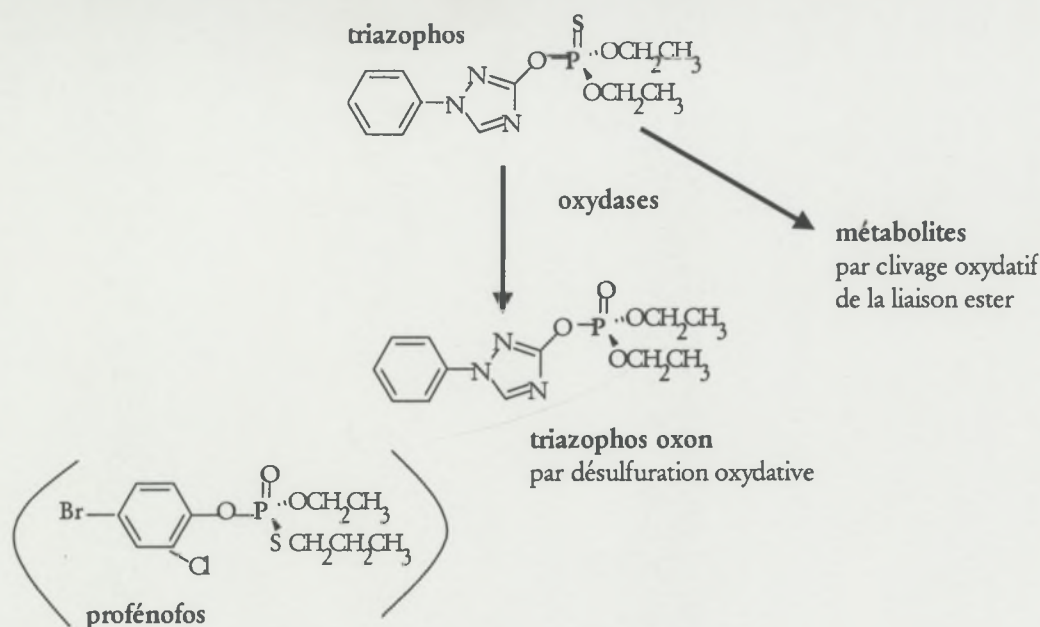


Figure 11 : dégradation du triazophos par les oxydases

Chez la souche sensible BK77, le triazophos oxon est apparu comme le meilleur synergiste de la deltaméthrine. Il n'y a pas eu de différence significative entre la DL_{50} de la deltaméthrine seule (0.055 $\mu\text{g/g}$) et celle de la deltaméthrine mélangée au triazophos (0.042 $\mu\text{g/g}$). Par contre, le triazophos oxon associé à la deltaméthrine a fortement accru (42 fois) la toxicité du mélange ($\text{DL}_{50} = 0.0013 \mu\text{g/g}$). Par contre sur la souche résistante BK99R5 c'est l'inverse qui a été obtenu : le triazophos a augmenté significativement la toxicité du mélange avec la deltaméthrine comparé à la deltaméthrine seule mais pas le triazophos oxon. Chez cette souche résistante le triazophos a pratiquement supprimé la résistance à la deltaméthrine en réduisant le facteur de résistance (FR_{50}) de 189 à 18 (tab. 11).

L'analyse des index de combinaisons calculés pour la deltaméthrine associée au triazophos ou au triazophos oxon au ratio 1:1 (tab. 12) m'a conduit aux mêmes conclusions. Un très fort synergisme a été montré sur la souche sensible BK77 entre deltaméthrine et triazophos oxon et sur la souche résistante aux pyréthrinoïdes BK99R5 entre deltaméthrine et triazophos (fig. 12).

4.6. Discussion

Chez *H. armigera*, la toxicité des pyréthrinoïdes peut être accrue par l'addition d'un OP insecticide. Cette augmentation peut être due à un effet additif des toxicités intrinsèques des deux produits mais dans la plupart des combinaisons testées une part de la toxicité du mélange provient d'un synergisme entre les deux insecticides. Sur la souche sensible, les OPs ont été utilisés à des doses très faibles compte tenu de la toxicité des pyréthrinoïdes et des ratios utilisés. L'augmentation

de la toxicité des mélanges peut donc être entièrement attribuée à l'effet synergique. Sur les souches résistantes de plus fortes doses de pyréthrinoides ont été nécessaires pour tuer les chenilles et par conséquent de fortes doses d'OP ont été utilisées. La mortalité des mélanges était donc due en partie à l'effet additif, en partie à l'effet synergique.

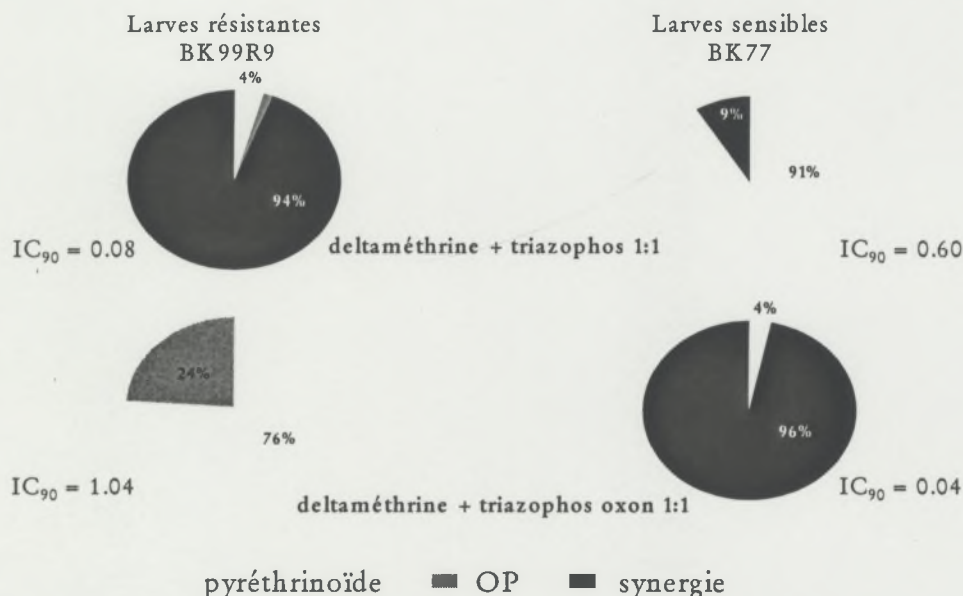


Figure 12 : comparaison de l'effet des mélanges deltaméthrine + triazophos (1:1) et deltaméthrine + triazophos oxon (1:1) sur des larves sensibles (BK77) et résistantes (BK99R9) de *H. armigera*.

L'effet synergique dépend à la fois du pyréthrinoloïde, de l'organophosphoré et de la souche. Chez la souche sensible, le synergisme a été observé avec les mélanges : cyperméthrine / éthion, cyperméthrine / profénofos et bétacyfluthrine / chlorpyrifos. Chez les souches résistantes, un fort synergisme a été observé avec les mélanges : cyperméthrine / éthion, deltaméthrine / triazophos et deltaméthrine / chlorpyrifos.

En Australie, la synergie entre le fenvalérate et le profénofos observée chez *H. armigera* est expliquée par l'inhibition par le profénofos des estérases impliquées dans le mécanisme de résistance aux pyréthrinoloïdes (Gunning *et al.* 1999). Une molécule de profénofos inhiberait une molécule d'estérase. Le synergisme d'un pyréthrinoloïde par la forme oxon d'un OP pourrait donc aussi être indicateur de l'inhibition de ces estérases. Or j'ai montré chez la souche sensible de *H. armigera* BK77 que : 1) le profénofos synergise la cyperméthrine, 2) le triazophos oxon synergise fortement la deltaméthrine. Ces synergies pourraient donc s'expliquer par l'inhibition des estérases par ces OP.

Si ce mécanisme explique que le triazophos oxon soit meilleur synergiste que le triazophos chez la souche sensible BK77, il n'explique pas pourquoi le triazophos est meilleur synergiste que le triazophos oxon chez la souche résistante BK99R5. Mon hypothèse est que les oxydases,

produites en plus grande quantité chez la souche résistante (cf 3), activent les OPs thiophosphate à travers une désulfuration oxydative ($P=S$ changé en $P=O$) en leur analogue oxon toxique (Champ, 1985). De plus, les deux insecticides (pyréthrinöide et OP) peuvent être des substrats compétitifs pour les mêmes oxydases. Par conséquent, chez la souche résistante, la liaison entre OP et oxydases : 1) active l'OP le rendant toxique, 2) empêche la liaison des oxydases avec le pyréthrinöide et donc sa métabolisation (fig. 11). L'action de l'OP sur les oxydases préviendrait la dégradation du pyréthrinöide entraînant une synergie soit par compétitivité des substrats (Kulkarni et Hodgson 1980 ; Feyereisen 1999) soit par la dégradation du site actif des oxydases sur lequel viendrait se lier l'atome de soufre relaché au cours de la désulfuration oxydative (Furakawa *et al.*, 1986). Cependant la possibilité d'avoir aussi une dégradation de l'OP par les mêmes oxydases ne peut être exclue. En effet, l'action des oxydases sur les OP peut aussi donner des métabolites non toxiques à travers l'hydroxylation des formes thioate ou oxon suivi par la dégradation oxydative de la liaison ester comme cela a été montré pour le diazinon chez des souches résistantes de drosophile, le ratio entre le clivage de la liaison ester et la désulfuration variant selon les oxydases (Dunkov *et al.*, 1997 ; Sabourault *et al.*, 2001)..

En conclusion il se pourrait que chez les larves sensibles les estérases métabolisent préférentiellement les pyréthrinöides et que leur inhibition par un OP sous forme oxon entraîne une synergie (fig. 13). Par contre chez les larves résistantes, les oxydases surproduites métaboliseraient préférentiellement les pyréthrinöides, leur inhibition par un OP sous forme thiophosphate entraînant une synergie.

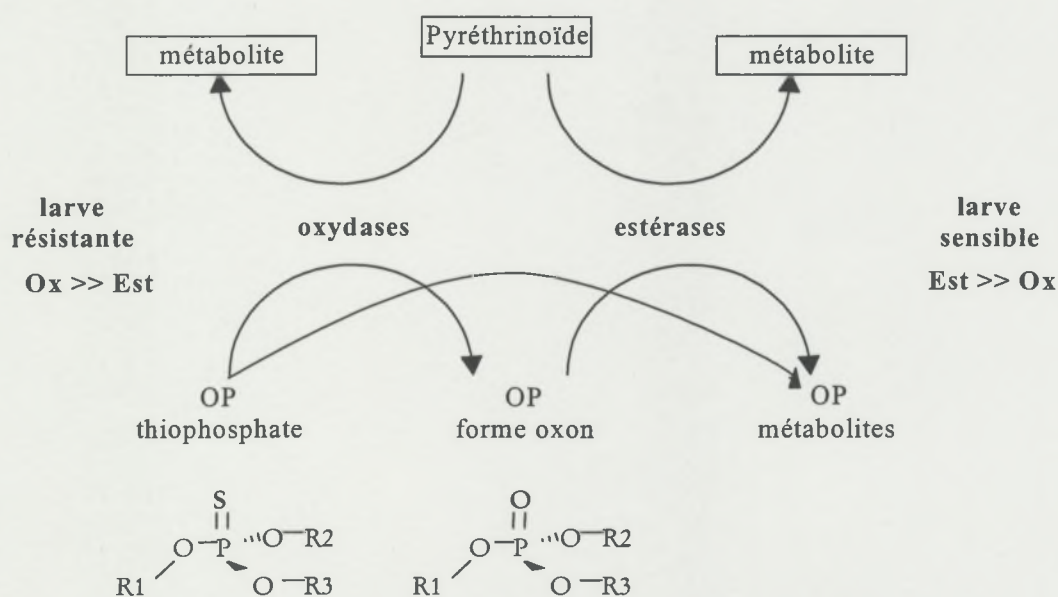


Figure 13 : Tentative d'explication de l'effet synergique des mélanges pyréthrinöides + OP chez les souches de *H. armigera* sensible et résistante aux pyréthrinöides.

Tableau 8. Toxicité des insecticides organophosphorés sur les souches sensible BK77 et résistantes (BK99R3 et BK99R5) de *H. armigera*.

souche	Matière active	N ^a	χ^2	Df ^b	pente \pm es	DL ₅₀ (95% LC) ($\mu\text{g/g}$)	FR ₅₀ ^c	DL ₉₀ (95% CL) ($\mu\text{g/g}$)
BK77	éthion	240	4.1	8	2.35 \pm 0.33	1062 (824-1285)	-	3727 (2916-5458)
	profénofos	144	3.4	4	5.14 \pm 0.92	6.840 (6.090-7.682)	-	12.14 (9.412-15.67)
	triazophos	144	0.9	4	2.92 \pm 0.90	104.8 (38.91-144.9)	-	288.2 (214.2-642.2)
	triazophos oxon	168	3.8	5	1.36 \pm 0.49	13.99 (0.078-38.85)	-	122.8 (50.01-358.7)
	chlorpyrifos	144	1.7	4	3.57 \pm 1.21	8.114 (1.808-11.62)	-	18.53 (13.81-29.10)
BK99R3	éthion	144	3.6	4	4.03 \pm 0.72	849 (687-1009)	0.8	1765 (1419-2597)
	profénofos	144	0.2	3	3.61 \pm 0.65	5.349 (4.417-6.429)	0.8	12.11 (9.362-19.59)
BK99R5	triazophos	191	4.6	6	1.96 \pm 0.24	27.82 (18.78-37.66)	0.3	125.1 (91.89-187.9)
	triazophos oxon	167	4.6	5	1.76 \pm 0.26	60.46 (36.92-84.31)	4.3	321.9 (232.2-519.9)
	chlorpyrifos	169	5.6	5	4.64 \pm 0.72	25.82 (20.59-30.11)	3.2	48.76 (42.09-59.86)

^a nombre de larve testée; ^b degré de liberté; ^c facteur de résistance = DL₅₀ souche résistante / DL₅₀ souche sensible

Tableau 9. Toxicité des pyréthrinoides seuls et en mélange avec les organophosphorés sur les souches sensible BK77 et résistantes (BK99R3 et BK99R5) de *H. armigera*, aux ratios utilisés dans les champs de coton.

souche	Matières actives	Ratio ^a	N ^b	χ^2	Dl ^c	pente \pm es	DL ₅₀ ^d (95% LC) ($\mu\text{g/g}$)	FR ₅₀ ^e	DL ₉₀ ^d (95% LC) ($\mu\text{g/g}$)
BK77	cyperméthrine	1:0	144	3.5	4	3.56 \pm 0.66	0.257 (0.206-0.299)	-	0.589 (0.477-0.874)
	cyperméthrine + éthion	1:10	144	1.4	4	3.48 \pm 0.79	0.077 (0.039-0.107)	-	0.180 (0.135-0.258)
	cyperméthrine + profénofos	1:10	144	1.0	4	3.22 \pm 0.90	0.094 (0.042-0.131)	-	0.235 (0.174-0.431)
	deltaméthrine	1:0	360	4.9	9	2.16 \pm 0.28	0.055 (0.043-0.066)	-	0.214 (0.165-0.320)
	deltaméthrine + triazophos	1:20	216	1.1	4	2.24 \pm 0.46	0.017 (0.010-0.024)	-	0.064 (0.051-0.079)
	deltaméthrine + chlorpyrifos	1:25	168	3.7	5	2.07 \pm 0.35	0.044 (0.020-0.070)	-	0.183 (0.125-0.283)
	cyfluthrine	1:0	195	0.8	3	2.95 \pm 0.61	0.067 (0.037-0.091)	-	0.182 (0.138-0.268)
	cyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	196	2.3	4	3.27 \pm 0.54	0.069 (0.057-0.083)	-	0.172 (0.134-0.264)
	bétacyfluthrine	1:0	215	0.5	3	3.51 \pm 0.69	0.099 (0.064-0.127)	-	0.231 (0.186-0.319)
	bétacyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	168	4.6	5	2.67 \pm 0.60	0.034 (0.011-0.056)	-	0.104 (0.067-0.145)
BK99R3	cyperméthrine	1:0	144	3.0	3	1.69 \pm 0.30	3.657 (1.413-6.195)	14	2.096 (1.400-33.64)
	cyperméthrine + éthion	1:10	144	1.4	3	2.69 \pm 0.48	0.435 (0.316-0.569)	6	1.303 (0.931-2.367)
	cyperméthrine + profénofos	1:10	264	3.9	5	2.78 \pm 0.43	0.535 (0.421-0.657)	6	1.546 (1.174-2.425)
BK99R5	deltaméthrine	1:0	264	11	8	2.45 \pm 0.37	10.40 (6.44-14.07)	189	34.75 (27.14-47.34)
	deltaméthrine + triazophos	1:20	168	5.1	5	2.32 \pm 0.33	0.450 (0.298-0.605)	26	1.602 (1.20-2.34)
	deltaméthrine + chlorpyrifos	1:25	168	1.0	5	5.42 \pm 0.92	0.682 (0.512-0.809)	16	1.176 (1.021-1.379)
	cyfluthrine	1:0	140	4.4	4	1.86 \pm 0.50	2.948 (0.945-4.691)	44	14.36 (9.258-39.05)
	cyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	144	0.3	4	3.05 \pm 0.41	0.712 (0.536-0.891)	10	1.875 (1.483-2.574)
	bétacyfluthrine	1:0	144	3.8	3	2.99 \pm 0.59	1.946 (0.965-2.803)	20	5.224 (3.858-7.152)
	bétacyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	144	0.5	3	2.82 \pm 0.74	0.433 (0.187-0.621)	13	1.233 (0.891-2.244)

^a Ratio pyréthrinoides/organophosphorés; ^b nombre de larve testée; ^c degré de liberté; ^d pour les mélanges, DL₅₀ et DL₉₀ sont calculées pour le pyréthrinoides seul; ^e facteur de résistance = DL₅₀ souche résistante / DL₅₀ souche sensible

Tableau 10. Index de combinaison, mortalité intrinsèque et synergique des mélanges pyréthriinoïde + organophosphoré chez les souches sensible BK77 et résistantes (BK99R3 et BK99R5) de *H. armigera*.

souche	Matière active	Ratio ^a	Au niveau de la DL ₅₀				Au niveau de la DL ₉₀			
			IC ₅₀ ^b ± es	%M _{py} ^c	%M _{op} ^c	%M _(py+op) ^d	IC ₉₀ ^b ± es	%M _{py} ^c	%M _{op} ^c	%M _(py+op) ^d
BK77	cyperméthrine + éthion	1:10	0.31 ± 0.03	6.6	0	93.4	0.35 ± 0.04	37.3	0	62.7
	cyperméthrine + profénofos	1:10	0.51 ± 0.04	12.4	0	87.6	0.61 ± 0.07	50.8	1.1	48.1
	deltaméthrine + triazophos	1:20	0.33 ± 0.03	27.0	0	73.0	0.27 ± 0.04	61.8	0	38.2
	deltaméthrine + chlorpyrifos	1:25	0.91 ± 0.11	78.8	0.2	21.0	0.84 ± 0.12	92.5	13.6	0
	cyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	1.24 ± 0.12	100	1.6	0	1.10 ± 0.17	95.2	13.6	0
	bétacyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	0.47 ± 0.05	12.2	0	87.8	0.57 ± 0.07	56.5	3.9	39.6
BK99R3	cyperméthrine + éthion	1:10	0.13 ± 0.01	22.4	0	77.6	0.05 ± 0.01	33.0	0	67.0
	cyperméthrine + profénofos	1:10	1.05 ± 0.13	26.0	43.8	30.2	1.34 ± 0.27	37.6	100	0
BK99R5	deltaméthrine + triazophos	1:20	0.38 ± 0.09	0	17.8	82.2	0.31 ± 0.09	1.6	57.8	40.6
	deltaméthrine + chlorpyrifos	1:25	0.73 ± 0.05	0.4	40.2	59.4	0.65 ± 0.06	1.0	61.9	37.1
	cyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	0.93 ± 0.07	24.8	44.2	31.0	1.04 ± 0.10	36.0	94.0	0
	bétacyfluthrine + chlorpyrifos	1:25	0.65 ± 0.05	4.8	7.4	87.8	0.94 ± 0.09	29.7	69.2	1.1

^a Ratio: pyréthriinoïde/organophosphoré; ^b IC₅₀ et IC₉₀ sont les index de combinaison à 50% et 90% de mortalité; ^c %M_{py} et %M_{op} sont les pourcentages de mortalité du pyréthriinoïde et de l'organophosphoré quand ils sont utilisés seuls; ^d %M_(py+op) est le pourcentage de mortalité du au synergisme du mélange (%M_(py+op) = 100 - %M_{py} - %M_{op}).

Tableau 11. Toxicité de la deltaméthrine seule et mélangée soit avec le triazophos soit avec le triazophos oxon chez les souches sensible BK77 et résistante BK99R5 de *H. armigera*

souche	Matières actives	Ratio ^a	N ^b	χ^2	DL ^c	pente \pm es	DL ₅₀ ^d (95% LC) ($\mu\text{g/g}$)	FR ₅₀ ^e	DL ₉₀ ^d (95% LC) ($\mu\text{g/g}$)
BK77	deltaméthrine	1:0	360	4.9	9	2.16 \pm 0.29	0.055 (0.043-0.066)	-	0.214 (0.165-0.320)
	deltaméthrine + triazophos	1:1	226	3.1	4	2.43 \pm 0.48	0.042 (0.025-0.056)	-	0.140 (0.102-0.245)
	deltaméthrine + triazophos oxon	1:1	120	1.2	3	1.50 \pm 0.71	0.0013 (0.0001-0.0035)	-	0.009 (0.003-0.015)
BK99R5	deltaméthrine	1:0	264	10.7	8	2.44 \pm 0.37	10.40 (6.45-14.07)	189	34.74 (27.14-47.34)
	deltaméthrine + triazophos	1:1	144	2.1	4	2.63 \pm 0.41	0.763 (0.478-1.036)	18	2.346 (1.793-3.288)
	deltaméthrine + triazophos oxon	1:1	180	1.4	3	1.63 \pm 0.50	3.833 (0.515-6.885)	2948	23.40 (14.95-72.31)

^a Ratio pyréthriinoïde/organophosphoré; ^b nombre de larves testées; ^c degré de liberté; ^d pour les mélanges, DL₅₀ et DL₉₀ sont calculées pour le pyréthriinoïde seul; ^e facteur de résistance = DL₅₀ souche résistante / DL₅₀ souche sensible

Tableau 12. Index de combinaison, mortalité intrinsèque et synergique de la deltaméthrine seule et mélangée au ratio 1:1 soit avec le triazophos soit avec le triazophos oxon chez les souches sensible BK77 et résistante BK99R5 de *H. armigera*

souche	matière active	Au niveau de la DL ₅₀				Au niveau de la DL ₉₀			
		IC ₅₀ ^a ± se	%M _{py} ^b	%M _{op} ^b	%M _(py+op) ^c	IC ₉₀ ^a ± se	%M _{py} ^b	%M _{op} ^b	%M _(py+op) ^c
BK77	deltaméthrine + triazophos	0.77 ± 0.07	76.8	0	23.2	0.60 ± 0.09	90.8	0	9.2
	deltaméthrine + triazophos oxon	0.02 ± 0.003	0	0	100	0.04 ± 0.009	3.4	0	96.5
BK99R5	deltaméthrine + triazophos	0.10 ± 0.01	0.4	0	99.6	0.08 ± 0.01	4.4	1.5	94.1
	deltaméthrine + triazophos oxon	0.36 ± 0.05	31.2	3.8	65.0	1.04 ± 0.13	76.1	27.3	0

IC₅₀ et IC₉₀ sont les index de combinaison à 50% et 90% de mortalité; ^b %M_{py} et %M_{op} sont les pourcentages de mortalité du pyréthriinoïde et de l'organophosphoré quand ils sont utilisés seuls; ^c %M_(py+op) est le pourcentage de mortalité du au synergisme du mélange (%M_(py+op) = 100 - %M_{py} - %M_{op}).

5. L'ANTI-RESISTANCE

Article 6 : Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hübner) to triazophos in West Africa *Insect Biochem Mol. Biol.*, 33, 883-887.

5.1. Introduction

L'utilisation d'insecticide ayant une résistance croisée négative avec les pyréthrinoïdes est une stratégie séduisante pour faire régresser la résistance. Dès lors, les traitements avec de tels produits sélectionneraient les individus sensibles des populations du champ diminuant ainsi leur niveau de résistance aux pyréthrinoïdes. Parmi les insecticides qui ont révélé une telle propriété (cf. 2.6.3), le triazophos a été choisi en raison de son utilisation en Afrique de l'Ouest pour lutter contre les acariens et les chenilles phyllophages du cotonnier. Les résultats des bioessais ont montré que le triazophos était trois fois plus toxique sur les larves issues de la souche sélectionnée à la deltaméthrine BK99R9 que sur les larves issues de la souche sensible BK77 (fig. 14).

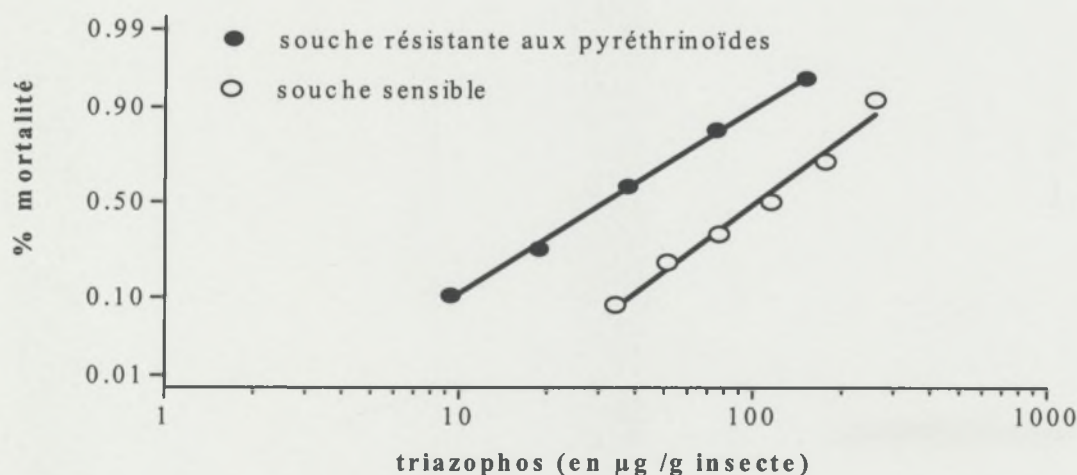


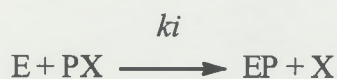
Figure 14 : Toxicité du triazophos sur les souches de *H. armigera* sensible () et résistante aux pyréthrinoïdes BK99R9 ().

Peu de cas de résistance croisée négative ont été décrit jusqu'à maintenant. La plupart sont relatifs à une modification de l'acétylcholinestérase (AChE), cible des insecticides organophosphorés (OP). Il s'agit de mutations ponctuelles qui procurent une résistance à des OP entraînant une sensibilité accrue à d'autres molécules (Hama et Iwata, 1978 ; Kyomura et Takahashi, 1979 ; Brown et Bryson, 1992 ; Zhu et Clark, 1994 ; Villatte *et al.*, 1999). Un autre cas concerne une augmentation de la sensibilité au chlorfénapyr chez des adultes d'une souche résistante de *Heliothis virescens* (Pimprale *et al.*, 1997). Le chlorfénapyr serait bioactivé par les oxydases

surexprimées dans la souche résistante. De la même façon, étant donné que la plupart des OPs sont des pro-insecticides qui doivent être oxydés pour être actifs, la surproduction d'oxydases qui métaboliseraient les pyréthriinoïdes pourraient aussi activer les OPs et accroître leur toxicité (Scott, 1999). Pour tester cette hypothèse, j'ai mesuré la quantité de triazophos sous forme oxon (triazophos oxon) présente dans des larves sensibles et résistantes de *H. armigera* pré-traitées avec une dose subléthale de triazophos.

5.2. La méthode de quantification du triazophos oxon

Pour pouvoir quantifier une faible dose de triazophos oxon dans une larve de second stade de *H. armigera* j'ai utilisé une méthode originale basée sur le mécanisme d'inhibition de l'AChE par un OP avec sa constante de réaction k_i suivant la réaction (Aldridge, N. 1950):



Avec E = enzyme, PX = organophosphoré, X = groupe partant. Le triazophos oxon phosphoryle le site actif de la sérine et l'inhibition peut être considérée comme irréversible au cours des 30 premières minutes. La disparition de l'enzyme [E] ou celle de l'organophosphoré [PX] suit une cinétique de second ordre telle que :

$$v = -\frac{d[E]}{dt} = -\frac{d[PX]}{dt} = k_i.[E].[PX] \quad \text{Equation 2}$$

L'intégration de cette équation permet d'estimer la quantité d'activité restante en fonction du temps d'incubation quand la concentration initiale de l'enzyme $[E_0]$ est différente de celle de l'inhibiteur $[PX_0]$.

$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{([PX_0] - [E_0]).e^{-k_i t.([PX_0] - [E_0])}}{[PX_0] - [E_0].e^{-k_i t.([PX_0] - [E_0])}} \quad \text{Equation 3}$$

$[PX]$ et $[E]$ sont les concentrations de l'inhibiteur et de l'enzyme au temps t . Les valeurs des variables $[E_0]$ et k_i sont estimées à partir d'une concentration initiale connue d'inhibiteur $[PX_0]$ et des régressions non linéaires multiples de l'équation 3.

Le triazophos-oxon est un bon inhibiteur de l'AChE purifiée de *Drosophila melanogaster* (Estrada-Mondaca et Fournier, 1998). Après 2 mn d'incubation, toutes les molécules d'inhibiteur avaient réagi avec l'enzyme. La réaction enzymatique du triazophos oxon sur l'AChE a été calibrée en suivant la variation de la quantité d'enzyme restante à différents intervalles de temps en prélevant des échantillons pour les faire réagir sur de l'acétylthiocholine (Ellman *et al.*, 1961). La constante d'inhibition de l'AChE (k_i) a été estimée à $503 \pm 33 \text{ L.}\mu\text{mole}^{-1}.\text{min}^{-1}$ et la quantité initiale

d'AChE [Eo] a été estimée à 12 ± 1 picomoles.ml⁻¹. Elle correspond à la quantité minimale de triazophos oxon qu'il faut ajouter à la solution pour inhiber toutes les molécules d'enzyme.

Les souches de *H. armigera* utilisées ont été BK77 pour la souche sensible et BK99R9 pour la souche sélectionnée à la deltaméthrine. Des larves issues de ces deux souches ont été traitées avec une dose subléthale de triazophos puis congelées après différentes périodes d'incubation. Après extraction au chloroforme, le triazophos oxon a été quantifié dans chaque larve en mettant l'extrait de larve en présence d'AChE et en suivant l'activité restante de l'enzyme avec le temps. Les données ont été fittées sur l'équation de la cinétique enzymatique en intégrant les valeurs de la concentration initiale de l'enzyme et le *ki*. Ainsi il ne restait plus qu'à estimer la concentration du triazophos oxon dans l'extrait. La limite de détection du triazophos oxon a été estimée à 0.3 pmole.ml⁻¹ de solution. La sensibilité de l'AChE de *H. armigera* au triazophos oxon était supposée identique pour les deux souches en raison des quantités d'AChE et des vitesses d'inhibition comparables que j'ai obtenu (données non publiées)

5.3. Le dosage du triazophos oxon

Le triazophos-oxon a été détecté de 1 heure à 12 heures après le traitement au triazophos avec un maximum détecté à 3 et 6 heures mais jamais après 18h d'incubation. Dans chaque souche, la quantité de triazophos oxon a été mesurée chez 106 larves traitées au triazophos 1, 3, 6 ou 12 heures avant et les données ont été regroupées pour être analysées. La proportion de larves contenant une quantité détectable de triazophos oxon (0.3 pmole par larve) était significativement plus forte ($P=0.047$) pour la souche résistante BK99R9 (23%) que pour la souche sensible BK77 (15%).

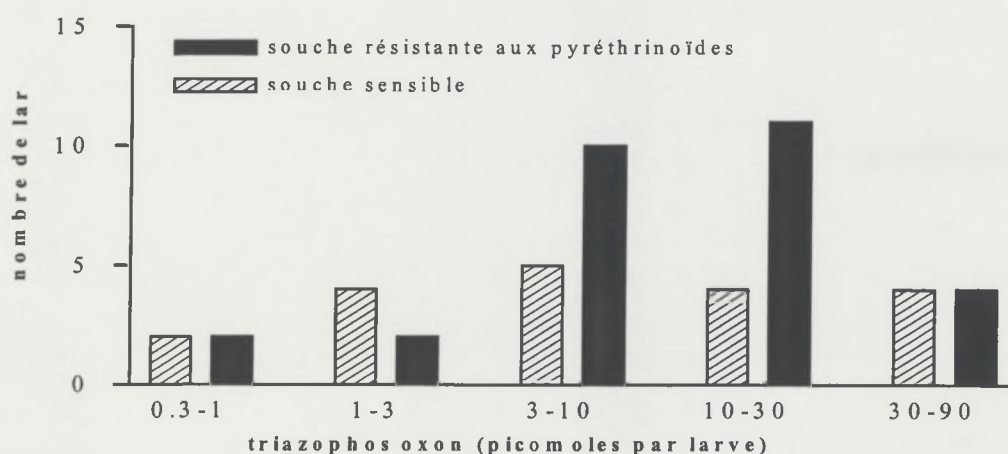


Figure 15 : Nombre de larves de *H. armigera* sensibles et résistantes aux pyréthriinoïdes contenant 0.3-1, 1-3, 3-10, 10-30, 30-100 picomoles de triazophos-oxon après application de 840 picomoles (5 µg/g d'insecte) de triazophos sur leur thorax.

Ces résultats suggèrent que la souche résistante produit plus de triazophos oxon que la souche sensible comme le confirme l'analyse de la quantité de triazophos oxon détectable dans les larves sensibles et résistantes (fig. 15). Ce résultat indique que l'accroissement de sensibilité du triazophos (x 3) chez la souche résistante pourrait provenir d'une transformation plus importante du triazophos en triazophos oxon, son métabolite actif.

5.4. Discussion

Mes résultats ont montré une résistance croisée négative significative au triazophos chez la souche de *H. armigera* résistante aux pyréthrinoïdes. Le triazophos, comme tous les phosphorothioates, n'est pas toxique. Il est activé par des oxydases de l'insecte en forme oxon toxique à travers une désulfuration oxydative (Kono *et al.*, 1983). Mais l'action de la même oxydase(s) peut aussi donner des métabolites non toxiques à travers la dégradation oxydative de la liaison ester (Dunkov *et al.*, 1997 ; Sabourault *et al.*, 2001). Chez la souche résistante BK99R9, une plus grande concentration d'oxydases a été observée chez une majorité de larves. Par ailleurs nos données ont montré qu'après un traitement au triazophos, un plus grand nombre de larves de la souche résistante contenaient du triazophos oxon ce qui pourrait expliquer la propriété anti-résistante du triazophos montrée par les bioessais. La faible différence de larve avec du triazophos oxon entre les souches sensible et résistante serait liée au faible facteur d'anti-résistance. Ainsi l'augmentation de la quantité d'oxydases dans les larves résistantes aux pyréthrinoïdes pourrait avoir comme effet secondaire l'augmentation du métabolisme oxydasique du triazophos produisant sa forme oxon toxique.

6. LA GESTION DE LA RESISTANCE

Article 7 : Ochou, O. G., T. Martin & N. F. Hala 1998. Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, West Africa, *In World Cotton Research Conference No. 2 September 6-12, 1998 Athens, Greece* pp. 833-837.

Article 8 : Ochou, O. G. & T. Martin 2002. Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner): Recent Developments and Prospects for its Management in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 1, 10-16.

Article 9 : Ochou, O. G. & T. Martin 2003. Activity spectrum of Spinosad and Indoxacarb: Rational for a differential resistance management strategy in West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 2, 75-81.

Article 10 : Martin, T., O. G. Ochou, A. Djihinto, D. Traore, M. Togola, M. Vaissayre & D. Fournier 2003. Control of insecticide resistant bollworms in West Africa. *Science*, (soumis)

6.1. Introduction

Les traitements répétés avec un même insecticide ne peuvent que réduire la proportion d'individus génétiquement sensibles dans une population. Les gènes qui confèrent la résistance vont passer des survivants traités à leur descendance, augmentant ainsi la fréquence de ces gènes dans la population. C'est un phénomène inéluctable. Auparavant, quand la résistance apparaissait, il y avait une autre famille chimique en remplacement. Aujourd'hui, compte tenu du coût et du temps de développement d'un pesticide, il devient de plus en plus difficile de disposer d'alternative chimique. La gestion mais surtout la prévention de la résistance deviennent donc une priorité. Pour cela tous les outils permettant de limiter les populations d'insectes et de réduire la pression de sélection des insecticides doivent être considérés. D'autre part une stratégie de gestion de la résistance n'est valable que si tous les agriculteurs de la région la connaissent, la comprennent et y adhèrent.

C'est sur ces bases que la première stratégie de prévention de la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'Ouest a été expérimentée au Tchad et au Cameroun au début des années 1990 (Renou et Martin, 1990, 1991, 1992). Cette stratégie était basée sur le modèle des fenêtres appliqué en Australie (Forrester et Cahill, 1987 ; Forrester *et al.*, 1993) préconisant la limitation des pyréthrinoïdes dans le temps et leur remplacement par d'autres insecticides chimiques. L'objectif à cette époque était non pas de gérer mais de prévenir la résistance aux pyréthrinoïdes, les études de laboratoire ne l'ayant pas encore diagnostiquée (Martin et Renou, 1995 ; Alaux, 1994). Mais en raison du surcoût à court terme que cela représentait, seul le Cameroun a développé cette stratégie préventive au milieu des années 1990 (Nibouche, com. perso.). Si elle n'a pas prévenu la résistance cette stratégie pourrait avoir contribué à l'absence d'échec de traitement au champ (Brévault, com. Perso.).

Dès le diagnostic de la résistance en Côte d'Ivoire (Vassal *et al.*, 1997) cette même stratégie a été immédiatement validée en milieu paysan et vulgarisée en 1998 dans la zone cotonnière de Korhogo (Ochou *et al.*, 1998c, 1999a). Cette année là toutes les autres régions cotonnières d'Afrique de l'Ouest ont connu des infestations fortes et précoces, des échecs de traitements aux champs et le mécontentement des planteurs mais surtout la confirmation de la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes en Côte d'Ivoire, au Bénin, au Mali et au Burkina Faso (Martin *et al.*, 2000 ; Vaissayre *et al.*, 2002). Pour mettre en commun nos connaissances et résoudre cette problématique au niveau régional, un projet régional a été initié en 1998 (Martin, 1997). Ce projet régional appelé PRAO (Prévention et Gestion de la Résistance de *Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoïdes en Afrique de l'Ouest) regroupe en réseau autour de la Recherche tous les acteurs des filières cotonnières des sept principaux pays concernés : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée, Mali, Sénégal et Togo. A partir de la campagne 1999 la stratégie de gestion de la résistance était adoptée avec succès dans toutes les zones cotonnières d'Afrique de l'Ouest.

6.2. La stratégie de gestion de la résistance en culture cotonnière

La stratégie de gestion de la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes en culture cotonnière qui a été proposée est basée sur la non-utilisation des pyréthrinoïdes jusqu'au 15 août et par l'utilisation dans les traitements suivants de mélanges synergisant pyréthrinoïde plus organophosphoré (photo 3). Les premières infestations d'*H. armigera* étant observées au début de la floraison autour du 15 juillet pour les semis précoces, l'absence de pyréthrinoïdes sur la première génération (1 mois) empêche la sélection des individus résistants. Les alternatives chimiques utilisées (endosulfan, profénofos, spinosad, indoxacarb) étant aussi efficaces sur les individus sensibles que résistants, les populations ont été bien contrôlées. Les traitements sur seuil d'infestation sont recommandés autant que faire se peut pour limiter la pression de sélection des insecticides et leur action sur les premiers stades larvaires. De plus, pour éviter les infestations de fin de campagne, il est recommandé aux agriculteurs d'éviter les semis tardifs.

6.2.1. Les alternatives aux pyréthrinoïdes

L'absence de résistance croisée de l'endosulfan et du profénofos avec les pyréthrinoïdes (cf. 2.7), leur toxicité sur les populations larvaires et leur activité sur des ravageurs secondaires (acariens, pucerons, chenilles phyllophages) justifient leur utilisation comme alternative aux pyréthrinoïdes. Par ailleurs si la résistance à l'endosulfan et au profénofos a été montrée chez *H. armigera* au Pakistan et en Australie, les oxydases ne seraient pas impliquées dans les mécanismes de résistance (Ahmad *et al.*, 1995 ; Gunning *et al.*, 1995 ; McCaffery, 1998). Cependant il y a toujours

un risque d'introduction de ces génotypes en Afrique de l'Ouest et de leur sélection ultérieure s'ils sont déjà présents sur le continent.

Des nouvelles molécules comme l'indoxacarb et le spinosad sont maintenant homologuées et recommandées en début de campagne. Elles n'ont pas montré de résistance croisée avec les pyréthriinoïdes et sont efficaces pour contrôler *H. armigera* (Ochou et Martin, 2003). La résistance de *H. armigera* au spinosad observée en Australie serait due à l'augmentation de l'activité des estérases (Gunning et Balfe, 2003). D'autre part elles ont l'avantage d'avoir une faible toxicité sur les mammifères et la faune utile (Borth *et al.*, 1996).

Pour prévenir de nouvelle résistance il est recommandé d'utiliser ces différentes molécules en mosaïque en tenant compte de leur spectre d'activité sur les autres ravageurs quitte à leur associer un autre insecticide si besoin est. L'utilisation des pyréthriinoïdes après le 15 août se justifie par leur coût, leur faible toxicité sur les mammifères et surtout leur excellente efficacité sur les autres chenilles de la capsule que sont *C. leucotreta* et *P. gossypiella* dans les zones sud et *D. watersi* et *Earias spp.* dans les zones du nord. D'autre part, la toxicité des pyréthriinoïdes sur *H. armigera* est renforcée par un mélange avec certains organophosphorés.

6.2.2. Les mélanges synergisant

En effet, la toxicité des pyréthriinoïdes sur les larves résistantes de *H. armigera* peut-être améliorée par l'addition d'un organophosphoré en plus grande quantité qui les concurrencent pour leur réaction avec les oxydases (cf. 4). Parmi les molécules testées, le triazophos est apparu comme étant le meilleur synergiste. Qui plus est, sa propriété de résistance croisée négative avec les pyréthriinoïdes en fait un outil intéressant pour faire régresser la résistance. Son utilisation est fortement recommandée. D'autres molécules comme le chlorpyrifos peuvent également synergiser les pyréthriinoïdes et renforcer leur efficacité au champ. Par contre la plus forte rémanence des pyréthriinoïdes par rapport aux OPs lorsqu'ils sont appliqués en mélange au champ pourrait avoir une influence sur la sélection des individus résistants.

6.3. L'impact de la gestion de la résistance

6.3.1. L'évolution de la résistance

Nos travaux de laboratoire ont montré que la stratégie de gestion de la résistance développée en Afrique de l'Ouest semble parfaitement adaptée au principal mécanisme responsable de la résistance chez *H. armigera* qui serait due à une augmentation de la dégradation des pyréthriinoïdes par les oxydases. Théoriquement, l'absence de résistance croisée avec les alternatives aux pyréthriinoïdes utilisées et l'utilisation des mélanges synergisant pyréthriinoïde plus

organophosphoré sur les populations résistantes ne pouvaient que renforcer l'efficacité de cette stratégie. Effectivement depuis 1996, le niveau de résistance semble avoir atteint un plateau.

6.3.2. Les infestations de *H. armigera*

De 1993 à 1997, les infestations moyennes dans les zones cotonnières du Nord de la Côte d'Ivoire ont été stables autour du niveau moyen de 7 larves / 1000 plants et sont en légère baisse depuis 1998 (fig. 16). Dans les zones du Sud, après une forte baisse en 1999, les infestations restent inférieures à 3 larves / 1000 plants. Les plus fortes infestations sont observées en octobre et novembre sur les semis tardifs (Ochou *et al.*, 1999b).

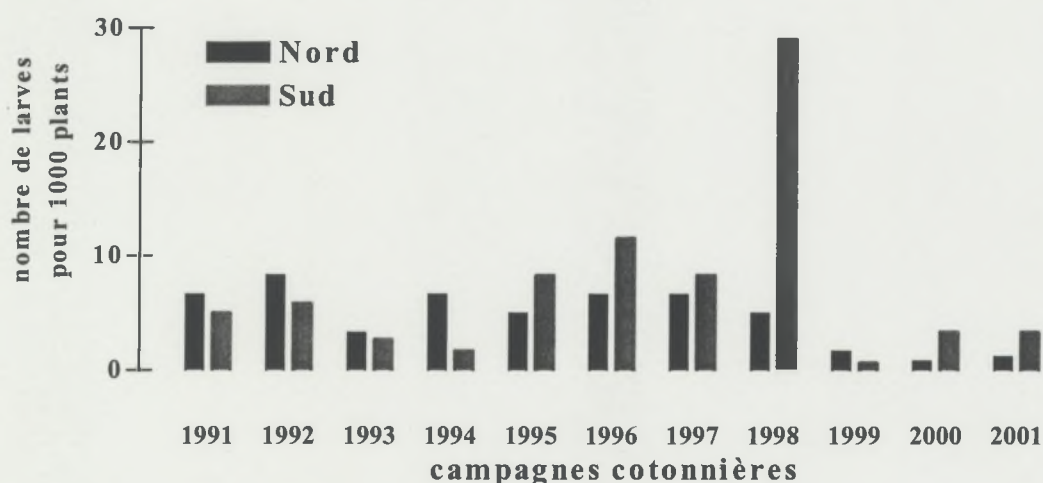


Figure 16 : Infestations larvaires moyenne de *H. armigera* dans les cultures cotonnières dans les zones Nord et Sud de la Côte d'Ivoire. La stratégie de gestion de la résistance a été appliquée en 1998 dans la zone Nord et en 1999 dans la zone Sud. Moyenne de 16 observations hebdomadaires dans 200 champs.

Le succès de la stratégie à l'échelle régionale se mesure aussi à l'absence d'infestation non contrôlée ces quatre dernières années à tel point qu'il est devenu difficile de trouver suffisamment de chenilles dans les champs pour mesurer le niveau de résistance. Par ailleurs je n'ai pas relevé d'information concernant des conditions climatiques particulières (pluviométrie, température,...) durant cette période par rapport aux années précédentes qui auraient pu expliquer ces faibles infestations.

La résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoides était déjà soupçonnée au Burkina Faso en 1991 (Nibouche, 1992 et 1993). Son développement a été probablement un des principaux facteurs de la baisse des rendements observée dans la région au cours des années 1990 (fig. 17). La généralisation de stratégie de gestion de la résistance en Afrique de l'Ouest pourrait être un des facteurs ayant contribué à l'augmentation en quantité et en qualité de la production de coton graine à partir de 1999. La lutte contre l'ensemble du spectre parasitaire du cotonnier a aussi été

sensiblement améliorée par cette nouvelle stratégie (Ochou *et al.*, 2001a) ce qui a compenser en partie le surcoût de la protection insecticide entraîné par l'utilisation d'alternatives aux pyréthrinoïdes.



Figure 17 : Rendement moyen en coton graine (en kg/ha) des pays qui appliquent la stratégie de gestion de la résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Sénégal et Togo (source : sociétés cotonnières).

6.3.2. Le coût de la résistance

Plus de deux millions d'agriculteurs cultivent en moyenne 1 hectare de coton en Afrique de l'Ouest. C'est la plus importante culture de rente de la région Soudano-Sahélienne qui procure plus de 50% des ressources financières de la population rurale. Elle contribue largement à lutter contre la pauvreté par le développement de l'agriculture et la scolarisation des élèves. Du fait de l'utilisation d'alternatives aux pyréthrinoïdes, la stratégie de gestion de la résistance a entraîné une augmentation du coût de la protection. En Côte d'Ivoire il est passé de 22.020 Fcfa/ha en 1998 à 29.175 Fcfa/ha en 2001 soit une augmentation de 25% (source CIDT). Sur 2 millions d'hectares cela représente une augmentation de 22 millions d'Euros sans compter les coûts sur l'environnement et la santé humaine dus à l'utilisation de produits plus toxiques (endosulfan).

Et ce coût peut encore augmenter si on se réfère aux pratiques des agriculteurs en Inde qui réalisent 20 à 30 traitements sur leur culture cotonnière avec des doses trois fois plus fortes qu'en Afrique de l'Ouest pour lutter contre les mêmes ravageurs devenus pour la plupart résistants aux principales familles chimiques avec des mécanismes multiples (Kranthi *et al.*, 2002).

6.4. Les traitements sur seuils

L'utilisation des traitements sur seuils d'infestation dans la stratégie de gestion de la résistance est une solution si ce n'est la seule pour réduire significativement les coûts de la protection. D'autant que plusieurs types de programmes ont déjà été validés depuis plusieurs années en Côte d'Ivoire (Ochou et Vaissayre, 1989 ; Ochou *et al.*, 1998b, 1999c). En 2000, les sociétés cotonnières ivoiriennes chargées du développement ont d'ailleurs commencé à former des agriculteurs à l'utilisation des seuils.

Les interventions sur seuils ont été limitées à la première fenêtre (soit 4 à 6 observations à raison d'une par semaine) pour les raisons suivantes : taille réduite des cotonniers en début de campagne donc temps d'observation réduit, absence de capsules qui pourraient être infestées par des chenilles endocarpiques, faible diversité des parasites, faibles niveaux d'infestations donc économies assurées et significatives car c'est la période d'utilisation des produits les plus coûteux.

Pour des raisons évidentes de succès, cette technique ne s'adresse qu'à des agriculteurs volontaires et motivés faisant de chacun un décideur indépendant : à l'aide d'un outil d'aide à la décision (photo 4), chaque agriculteur décide de traiter ou de ne pas traiter son champ en fonction de l'intensité du parasitisme. La protection sur seuil permet aussi de pouvoir surveiller régulièrement le parasitisme au cours de la campagne et d'intervenir contre les premiers stades larvaires de *H. armigera* qui sont les plus faciles à éliminer.

Le suivi des agriculteurs ayant utilisé cette technique au cours de la campagne 2000 en Côte d'Ivoire a donné des résultats positifs (Ochou *et al.*, 2001b) : Le nombre de traitement a diminué significativement et du même coup l'impact des insecticides sur l'environnement. En plus les agriculteurs ont appris à reconnaître les différents ravageurs et les risques qu'ils représentent pour la culture. Même si l'effort en formation est important, il est déjà payant à court terme mais il le sera surtout à plus long terme.

6.5. Discussion

En général, les stratégies développées pour contrôler la résistance des insectes aux insecticides sont basées sur l'utilisation de mélanges d'insecticides ayant des modes d'action différents, l'alternance de différents insecticides dans le temps par la rotation des insecticides ou dans l'espace avec des traitements en mosaïques, la mise en place de zones refuges non traitées permettant le maintien d'un pool d'individus sensibles (Leeper *et al.*, 1986). Dans la pratique, les stratégies pour gérer la résistance de *H. armigera* semblent avoir bien fonctionné en Israël (Horowitz *et al.*, 1993) et en Australie où elles sont utilisées depuis presque 20 ans même si la

situation continue de se détériorer, la résistance augmentant régulièrement (Forrester *et al.*, 1993 ; Gunning 2002).

La stratégie de gestion de la résistance développée en Afrique de l'Ouest repose essentiellement sur la suppression des pyréthrinoïdes jusqu'au 15 août et leur remplacement par l'endosulfan. Compte tenu du coût et de la toxicité de ce produit sur les mammifères, le réseau PR-PRAO recommande le développement des traitements sur seuil et l'utilisation de nouvelles molécules moins toxiques pour l'environnement comme l'indoxacarb et le spinosad. La résistance étant un phénomène dynamique dont les paramètres peuvent changer d'une saison ou d'une année sur l'autre, la stratégie doit être continuellement revue et adaptée.

La particularité de cette stratégie repose sur l'organisation de la filière cotonnière. Ce type d'organisation entre égreneurs et agriculteurs a permis de gérer avec succès l'utilisation des insecticides par plus de 2 millions d'agriculteurs en maintenant la résistance aux pyréthrinoïdes au dessous d'un seuil auquel ces produits peuvent toujours être utilisés efficacement. Mais si les enjeux de la résistance commencent à être appréhendés par les responsables des sociétés cotonnières c'est loin d'être le cas pour les agriculteurs. Pour ces derniers qui ne connaissent pas le phénomène de résistance, un insecticide est efficace ou il ne l'est pas. Aussi, avant la libéralisation totale de la filière cotonnière, il devient urgent de passer à l'étape suivante qui consiste à former les agriculteurs à cette notion de gestion de résistance afin qu'ils la connaissent, la comprennent et y adhèrent. Cette étape de formation doit concerner également les maraîchers qui sont, du fait de la résistance de *H. armigera* et de l'absence d'organisation, dans une spirale d'utilisation des insecticides. L'échec de la lutte chimique contre ce ravageur avec des produits mal adaptés, le plus souvent non homologués, pousse les agriculteurs à multiplier les traitements et à augmenter les doses. Si ces pratiques permettent une productivité élevée de la terre et du travail, elles s'accompagnent d'effets secondaires importants : intoxication des utilisateurs, transfert de micro-polluants dans les eaux et le sol, résidus dans les cultures récoltées juste après les traitements, résistances des insectes aux insecticides mettant en cause à court ou moyen terme la viabilité économique de ces systèmes de production mais aussi de la culture cotonnière. La gestion et la prévention de la résistance des insectes aux insecticides, encore peu répandue en Afrique, est sans aucun doute le plus gros challenge des prochaines années.

7. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En Afrique de l'Ouest, on a assisté à une progression importante des superficies cotonnières ces dernières années qui sont passées de 800.000 en 1984 à 2.200.000 ha en 1997 (Raymond, 1998) et au développement des cultures maraîchères notamment la tomate et le haricot, attaquées elles aussi par *H. armigera* et qui reçoivent un à deux traitements par semaine pendant la saison des pluies et une bonne partie de la saison sèche avec les mêmes « produits coton » (Dagnoko, 1996). Cette évolution des systèmes de cultures ne pouvait que réduire les zones refuges (maïs et autres plantes hôtes), intensifier la pression de sélection sur les ravageurs et donc accroître le risque de sélectionner des insectes résistants aux insecticides.

Le suivi annuel de la sensibilité de *H. armigera* aux insecticides m'a permis de confirmer la résistance aux pyréthrinoides et trouver ainsi une explication aux échecs des traitements en culture cotonnière. Cette résistance est croisée à tous les types de pyréthrinoides mais à des degrés divers, d'où l'intérêt de diversifier les molécules utilisées sur le terrain. Ces cinq dernières années, les populations collectées en Côte d'Ivoire se sont toutes révélées résistantes quel que soit le lieu de collecte, la plante hôte et la période de l'année. Leurs facteurs de résistances variaient entre 5 et 40 pour la deltaméthrine et étaient généralement plus élevés en fin de campagne cotonnière. Ceci dit, ils sont restés très inférieurs à ceux des populations collectées au Bénin, au Togo et au Burkina Faso en 1998 (Kathary *et al.*, 1999 ; Traore *et al.*, 1999). Ces résultats laissent supposer que la résistance est restée modérée en Côte d'Ivoire et qu'elle ne s'est pas encore stabilisée. D'autres études montrant la baisse du niveau de résistance des populations élevées au laboratoire en l'absence de pyréthrinocide semblent le confirmer (Djihinto *et al.*, soumis). D'après ces auteurs, la résistance aurait un coût : les chenilles résistantes auraient un temps de développement plus long que les sensibles ce qui les pénaliserait en l'absence de traitement avec des pyréthrinoides.

Ces résultats suggèrent également un brassage des populations entre les différentes plantes hôtes et renforcent l'hypothèse avancée par Nibouche (1994) de l'existence de mouvements migratoires saisonniers des papillons entre les agrosystèmes et dans toute la région. L'étude de la variabilité génétique des populations, par des marqueurs moléculaires, pourrait permettre d'estimer l'importance des flux migratoires qui existent entre elles. Sachant que l'apparition d'un gène de résistance dans une population résulte soit d'une mutation apparue spontanément puis sélectionnée sur place soit de son introduction par migration puis de sa sélection, l'identification des cultures et des zones à risque où la sélection est la plus forte permettrait de prendre des

mesures pour mieux gérer la résistance et prévenir le développement de nouveaux mécanismes.

Actuellement, le principal mécanisme de résistance de *H. armigera* aux pyréthrinoïdes pourrait s'expliquer par une augmentation de leur métabolisation par les oxydases ou monooxygénases à cytochrome P450. Plusieurs résultats semblent le confirmer : 1/ une résistance croisée à tous les types de pyréthrinoïdes, 2/ une plus forte concentration d'oxydases chez les larves résistantes par rapport aux larves sensibles, 3/ la suppression de la résistance par un inhibiteur d'oxydases (PBO), 4/ une résistance croisée négative ou positive avec des thiophosphates, 5/ une activation du triazophos plus importante chez les larves résistantes que chez les sensibles. Des bioessais réalisés sur une souche collectée au Bénin en 1997 (Djihinto, 1999) et au Cameroun en 2002 (non publié) confirment en partie ces résultats. Par ailleurs les croisements ont montré que ce type de résistance serait dominant et se comporterait de manière monogénique (Vassal, comm. perso.). L'étape suivante consistera à rechercher le ou les gènes d'oxydases (CYPs) sur-exprimés dans les souches résistantes à partir des travaux déjà réalisés dans ce domaine chez les heliothinae (Rose *et al.*, 1997 ; Pittendrigh *et al.*, 1997 ; Ranasinghe et Hobbs, 1999 ; Li *et al.*, 2000). L'objectif de ces travaux étant l'élaboration d'un test moléculaire qui permettrait de caractériser les individus provenant de différentes zones géographiques ou de différents agrosystèmes et ainsi de pouvoir établir une relation entre les pratiques phytosanitaires et la sélection de la résistance. La caractérisation de la résistance des populations de *H. armigera* issues de différentes zones géographiques d'Afrique de l'Ouest mais aussi d'autres régions où la résistance est suspectée comme l'Afrique du Sud (Van Jaarsveld *et al.*, 1998) ou l'Ethiopie (Terefe, comm. perso), permettrait d'identifier les agrosystèmes à risque et de prendre les mesures nécessaires pour une gestion à plus long terme de la résistance et peut-être détecter la sélection de nouveaux mécanismes.

En effet, des mécanismes secondaires pourraient également exister dans les souches résistantes faisant intervenir d'autres enzymes de métabolisation notamment des estérases ou une modification de la cible des pyréthrinoïdes à savoir les canaux sodium voltage dépendant (mécanisme *kdr*).

Concernant les estérases, la variabilité de l'activité des estérases dans les souches résistantes suggère que les estérases se soient quelque peu différenciées de celles de la souche sensible élevée en laboratoire depuis plus de 20 ans. Soit qu'elles ne réagiraient pas avec les substrats chromogènes utilisés habituellement sur *H. armigera* et *H. virescens* (Kranthi *et al.*, 1997, Gunning *et al.*, 1996 et Zhao *et al.*, 1996), soit que leur efficacité catalytique ait été modifiée, soit qu'elles auraient une action sur la régulation des gènes d'oxydases à l'instar

du modèle proposé par Sabourault *et al.* (2001) chez la mouche domestique dont la résistance due aux oxydases et aux GST a été observée chez des souches à faible activité estérasique (Sabourault *et al.*, 2001). D'après ces auteurs, une mutation sur un gène d'estérase agissant comme un répresseur transcriptionnel entraînerait la sur-transcription des gènes codant pour la détoxification enzymatique tel que CYP6A1 et donc une résistance métabolique. Cependant je n'ai pas trouvé de corrélation entre l'activité des estérases ou des GST et la résistance des populations sélectionnées à la deltaméthrine ou collectées sur le terrain ce qui voudrait dire que si ces mécanismes enzymatiques existent ils ne seraient pas très répandus. L'identification des gènes codant pour la détoxification enzymatique mais également ceux susceptibles d'avoir un rôle régulateur (ali-estérase) devrait permettre de mieux comprendre l'implication directe ou indirecte des estérases. Ce type de mécanisme est d'autant plus important à comprendre qu'il peut entraîner des résistances croisées à plusieurs familles d'insecticides.

Concernant la cible commune des pyréthrinoides et du DDT, la résistance aux pyréthrinoides des populations de *H. armigera* d'Afrique de l'Ouest ne serait pas due à une modification des canaux sodium. Ce qui voudrait dire que ni les organochlorés utilisés dans les années 1960s et 1970s, ni les pyréthrinoides ensuite, n'auraient sélectionné le gène *kdr*. Ce qui expliquerait l'efficacité des pyréthrinoides pendant plus de 15 ans en Afrique de l'Ouest contrairement à l'apparition brutale de la résistance en Asie et en Australie peu après leur introduction (McCaffery *et al.*, 1998). Soit la mutation *kdr* n'existerait pas dans les populations Africaines soit les pratiques phytosanitaires particulières dans cette région notamment l'utilisation raisonnée des mélanges d'insecticides et les pratiques culturales en culture cotonnière, n'auraient pas permis de la sélectionner. Ce point pourrait être confirmé par la recherche des mutations ponctuelles au niveau du canal sodium qui ont déjà été identifiées chez *H. armigera* (souche Oxford, Afrique du Sud) et *H. virescens* et qui seraient impliquées dans la résistance aux pyréthrinoides (Park *et al.*, 1997 ; Head *et al.*, 1998).

Des mélanges d'insecticides peuvent améliorer le contrôle des insectes devenus résistants. Il est possible d'accroître la toxicité des pyréthrinoides sur *H. armigera* en leur associant un organophosphoré, au-delà de l'effet additif de la toxicité intrinsèque des deux insecticides. Mes travaux ont montré que des mélanges synergisant pour la souche résistante de *H. armigera* l'étaient moins ou pas du tout pour la souche sensible et réciproquement. En effet, la meilleure synergie sur la souche résistante a été obtenue avec le mélange deltaméthrine plus triazophos (un thiophosphate) et avec le mélange cyperméthrine plus profénofos (un phosphate) sur la souche

sensible. La synergie entre pyréthrianoïde et organophosphoré pourrait s'expliquer soit par la compétition de l'OP pour les oxydases (Feyereisen, 1999), soit par l'inhibition des estérases (Gunning *et al.* 1999), qui entraînerait un ralentissement de la dégradation des pyréthrianoïdes. Notre hypothèse chez la souche résistante est que la même oxydase(s) produite en plus grande quantité, activerait les thiophosphates à travers une désulfuration oxydative en leur analogue oxon toxique. Sachant que cette oxydase(s) peut aussi donner des métabolites non toxiques à travers l'hydroxylation des formes thioate ou oxon suivie par la dégradation oxydative de la liaison ester. Par contre chez la souche sensible, les pyréthrianoïdes pourraient être préférentiellement métabolisées par les estérases et c'est leur inhibition par un phosphate ou un OP sous forme oxon, donc capable d'inhiber l'acétylcholinestérase ou les autres estérases sans être oxydé auparavant, qui entraînerait une synergie.

Lors de la recherche de résistance croisée entre les pyréthrianoïdes et d'autres matières actives chez *H. armigera*, le triazophos s'est révélé plus toxique sur la souche résistante que sur la souche sensible. Mon hypothèse sur l'activation du triazophos par les oxydases semble avoir été confirmée par le fait que j'ai trouvé plus de larves contenant du triazophos oxon chez la souche résistante que chez la souche sensible après avoir été toutes deux traitées au triazophos. Ainsi l'augmentation de la quantité d'oxydases dans les larves résistantes aux pyréthrianoïdes pourrait avoir comme effet secondaire l'augmentation du métabolisme oxydasique du triazophos produisant sa forme oxon toxique. D'où la résistance croisée négative observée avec le triazophos. Par conséquent, l'utilisation de ce produit plus toxique sur les individus résistants que sur les sensibles pourrait être un outil capable de faire régresser la résistance. C'est pourquoi son utilisation doit être encouragée préférentiellement à d'autres OP comme le chlorpyrifos et l'isoxathion qui auraient plutôt l'effet inverse.

Sur la base de ces résultats, la stratégie que j'ai recommandé pour gérer la résistance de *H. armigera* aux pyréthrianoïdes a été la suivante : 1/ la précocité des dates de semis, pour éviter les fortes infestations de fin de campagne, 2/ la non-utilisation des pyréthrianoïdes jusqu'au 15 août pour limiter la pression de sélection sur la première génération, 3/ l'utilisation de l'endosulfan pour les deux premiers traitements, en raison de l'absence de résistance croisée avec les pyréthrianoïdes, 4/ l'utilisation de mélanges pyréthrianoïde plus organophosphoré synergisant, pour accroître leur efficacité. Grâce à l'organisation de la filière cotonnière en Afrique de l'Ouest et à l'action du réseau PRAO associant les centres de recherche nationaux et le CIRAD, cette stratégie de gestion de la résistance a pu être adoptée et appliquée dès 1999 sur plus de 2 millions d'hectares de culture cotonnière répartis dans 7 pays. La remontée de la production cotonnière, l'absence

d'infestations non contrôlées et la difficulté à collecter des populations au champ ces quatre dernières années sont autant d'indicateurs du succès de cette stratégie. L'utilisation d'autres alternatives aux pyréthrinoides en mosaïque avec l'endosulfan d'une part et le développement des traitements sur seuils d'infestation d'autre part devraient permettre d'optimiser l'efficacité de cette stratégie en diversifiant les familles chimiques tout en limitant globalement le nombre de traitements insecticides. Avant la libéralisation complète de la filière cotonnière, la diffusion d'un message technique doit aussi être une priorité. Pour cela, les thématiques de recherche, indispensables pour mieux comprendre ce phénomène et faire évoluer la stratégie actuelle, devraient être complétées par une investigation de type technique et linguistique auprès des agriculteurs et déboucher sur la production de messages en langue vernaculaire.

Mais l'utilisation intensive et non contrôlée des produits phytosanitaires dans les périmètres maraîchers met sérieusement en péril la durabilité de la stratégie de gestion de résistance appliquée en culture cotonnière. Il est devenu impératif de sensibiliser les services publics afin que des actions soient entreprises auprès des maraîchers pour les informer de ce qu'est la résistance et la nécessité de la gérer avant de se retrouver face à une augmentation exponentielle de la quantité d'insecticides qui entraînera des pertes économiques et aura un impact négatif sur la santé publique.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad, M. & A. R. McCaffery 1988. Resistance to insecticides in a Thailand strain of *Heliothis armigera*. *J. Econ. Entomol.*, 81, 45-47.
- Ahmad, M., R. T. Gladwell & A. R. McCaffery 1989. Decreased nerve insensitivity is a mechanism of resistance in a pyrethroid resistant strain of *Helicoverpa armigera* from Thailand, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 35, 165-171.
- Alaux T. 1994. Prévention de la résistance aux pyréthrinoides chez *Helicoverpa armigera* (Hubner) en Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat 22/12/94. Institut National Polytechnique, Toulouse, France, pp 133.
- Aldridge, N. 1950. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.*, 46, 451-460.
- All, J. N., M. Ali, E. P. Hornyak & J. B. Weaver 1977. Joint action of two pyrethroids with methyl-parathion, methomyl, and chlorpyrifos on *Heliothis zea* and *H. virescens* in the laboratory and in cotton and sweetcorn. *J. Econ. Entomol.*, 70, 813-817.
- Angelini, A. & R. Couilloud 1976. Premiers résultats obtenus en Côte d'Ivoire avec les pyréthrinoides dans la lutte contre les ravageurs du cotonnier. *Cot. Fib. Trop.*, 31, 323-326.
- Angelini, A. & P. Vandamme 1965. Onze année d'expérimentation insecticide en Côte d'Ivoire. *Cot. Fib. Trop.*, 20, 531-538.
- Angelini, A., J. P. Trijeau & M. Vaissayre 1982. Activité comparée de trois pyréthrinoides de "première génération" et d'un certain nombre de pyréthrinoides nouveaux contre les chenilles de la capsule du cotonnier. *Cot. Fib. Trop.*, 37, 359-364.
- Balla, A. N., 1982. Progress in research and developement for *Heliothis* management in the Sudan. In Reed (Ed.) *Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management*, ICRISAT, Patancheru, Inde, 363-368.
- Borth, P. W., P. J. McCall, R. R. Bischoff & G. D. Thompson 1996. The environmental and mamalian safety profile of Naturalyte insect control. In *Proceedings Beltwide Cotton conferences*, 2, 690-692.
- Bournier, J.-P. & J. Y. Peyrelongue 1973. Introduction, élevage et lâchers de *Trichogramma brasiliensis* Ashm. (Hym. Chalcididae) en vue de lutter contre *Heliothis armigera* Hbn. (Lep. Noctuidae) à Madagascar. *Cot. Fib. Trop.*, 28, 231-236.
- Brogdon, W. G., J. C. McAllister & J. Vulule 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance, *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 13, 233-237.

- Brown, T. M. & P. K. Bryson 1992. Selective inhibitors of methyl parathion-resistant acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 44, 155-164.
- Camerone, P. J. & W. Valentine 1989. Importation and establishment of new natural enemies of *Heliothis* spp. in New Zealand. In King E.G. and Jackson R. D. (Ed.) *Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis*, Ferro, USDA, NewDehli, India, 397-410.
- Campanhola, C. & F. W. Plapp Jr. 1989. Toxicity and synergism of insecticides against susceptible and pyrethroid-resistant third instars of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 82, 1495-1501.
- Cauquil, J., 1981. Utilisation de deux pyréthrinoides de synthèse (deltaméthrine et cyperméthrine) pour la protection des cultures cotonnières de la République Centrafricaine. *Cot. Fib. Trop.*, 36, 227-231.
- Cauquil, J., 1985. La protection des cotonniers contre les ravageurs en Afrique francophone au sud du Sahara : principe et évolution des techniques. *Cot. Fib. Trop.*, 40, 187-194.
- Cayrol, R., S. Poitout & P. Anglade 1974. Etude comparée des caractères biologiques respectifs de quelques espèces de Noctuidae plurivoltines migrantes et sédentaires. *Annales de Zoologie et d'Ecologie Animales*, 6, 1-10.
- Champ, P. 1985. Mode d'action et utilisation des organophosphorés. Colloque national, *Mode d'action et utilisation des insecticides*, Angers, France, 225-245.
- Chou, T. C. & P. Talalay 1984. Quantitative analysis of dose-effect relation-ships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enz. Regul.*, 22, 27-55.
- Clarke, S. E., C. H. Walker & A. R. McCaffery 1990. A comparison of the in vitro metabolism of cis-cypermethrin in a resistant and susceptible strain of *Heliothis virescens*. In *Proc Brighton Crop Protect. Conference: Pest and Diseases*, Farnham, UK: The British Crop Protection Council, 1201-1206.
- Couilloud, R. & M. Giret 1980. Multiplication d'*Helicoverpa armigera* (Hübner) : améliorations possibles grâce à l'adoption d'une technique d'élevage en groupe de chenilles. *Cot. Fib. Trop.*, 35, 217-224.
- Dagnoko, M., 1996. Contraintes parasitaires des cultures maraîchères dans cinq zones géographiques de la Côte d'Ivoire. *Rapport de stage de DAA*, Cyanamid, INP-HB Ecole Supérieure d'Agronomie, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.
- Daly, J. C. & P. Cregg 1985. Genetic variations in *Heliothis* in australia : species identification and gene flow in the two pest species *H. armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera : Noctuidae). *Bull. Ent. Res.*, 75, 169-184.

- Deguine J.-P. & G. Ekukole 1994. A new cotton crop programme in Cameroon. *Agriculture et développement, Special issue*, 41-45.
- Deguine, J.P., G. Ekukole & E. Amiot 1993. La lutte étagée ciblée , un nouveau programme de protection insecticide en culture cotonnière au Cameroun. *Cot. Fib. Trop.*, 48, 99-119.
- Djihinto, A. C., 1999. La résistance aux pyréthrinoides chez *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera : Noctuidae) sur le cotonnier au Nord Bénin. *Rapport de stage de DAA, Document interne CIRAD*, pp. 36.
- Djihinto, A. C., P. Prudent, E. Pathinvo, J-M. Vassal, A. Katary & D. Fournier Stability of resistance to pyrethroids in *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Benin Republic. (soumis)
- Dong, Y., P. Zhuang & Z. Tang 1999. Cytochrome P450 monooxygenase associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Entomol. Sinica*, 6, 92-96.
- Dunkov, B. C., Guzov, V. M., Mocelin, G., Shotkoski, F., Brun, A., Amichot, M., Ffrench-Constant, R. H., Feyereisen, R., 1997. The Drosophila cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. *DNA Cell. Biol.* 16, 1345-1356.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Anres & R. M. Featherstone 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*, 7, 88-95.
- Estrada-Mondaca, S. & D. Fournier 1998. Stabilization of recombinant Drosophila acetylcholinesterase. *Prot. Exp. Purif.* 12, 166-172.
- Fang, C. Y., S. G. Wen & F. Q. Hu 1989. Protection and utilization of the principal natural enemies to control *Heliothis armigera* in China. In King E.G. and Jackson R. D. (Ed.) *Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis, Ferro, USDA, NewDehli, India*, 441-448.
- Farrow, R. A. & J. C. Daly 1987. Long-range movement as an adaptative strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera : Noctuidae) : a review of its occurrence and detection in four pest species. *Australian Journal of Zoology*, 35, 1-24.
- Feyereisen, R. 1983. Polysubstrate monooxygenases (cytochrome P450) in larvae of susceptible and resistant strains in house flies, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 19, 262-269.
- Feyereisen, R. & D. R. Vincent 1984. Characterisation of antibodies to house fly NADPH-cytochrome P450 reductase, *Insect Biochem.*, 14, 163-171.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 44, 507-533.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. 3rd Edition, *Cambridge University Press*, pp 333.
- Fitt, G. P., 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, 34, 17-52.

- Forrester, N. W., M. Cahill, L. J. Bird & J. K. Layland 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res.* Supplement Series N°1. pp 132.
- Furakawa, N., M. Sato & Y. Suzuki 1986. Effects of alkyl phosphorothioates on the hepatic microsomal mixed function oxidase system in rats. *Biochem. Pharm.*, 35, 1019-1026.
- Goebel, R. & P. Jacquemard 1990. Evaluation du niveau de sensibilité de *H. armigera* Hübner, déprédateur de la capsule du cotonnier aux associations cyperméthrine-chlorpyrifos et cyperméthrine-méthyl parathion. Etude des interactions possibles entre ces insecticides. *Cot. Fib. Trop.*, 45, 137-143.
- Goh, D. K. S., D. D. Anspaugh, N. Motoyama, G. C. Rock & R. M. Roc 1995. Isolation and characterisation of an insecticide resistance associated esterase in the tobacco budworm *Heliothis virescens* F., *Pestic. Biochem. Physiol.*, 51, 192-204.
- Goulston, G. & K. Brake 1997. Profiting from resistance management. *PJB Publications Ltd*, pp 132.
- Gunning, R. V., C. S. Easton, L. R. Greenup & V. E. Edge 1984. Synthetic pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) in Australia. *J. Econ. Entomol.*, 77, 1283-1287.
- Gunning, R. V., N. W. Forrester, C. S. Easton & L. R. Greenup 1990. Relationship between DDT and pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera : Noctuidae) in Australia. *Trop. Pest Manag.*, 36, 3, 293-295.
- Gunning, R. V., C. S. Easton, M. E. Balfe & I. G. Ferris 1991. Pyrethroid resistance mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Sci.*, 33, 4, 473-490.
- Gunning, R. V., A. L. Devonshire & G. D. Moores 1995. Metabolism of esfenvalerate by pyrethroid-susceptible and -resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Pest. Biochem. Physiol.*, 54, 205-213
- Gunning, R. V. 1996. Bioassay for detecting pyrethroid nerve insensitivity in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *J. Econ. Entomol.*, 89, 817-819.
- Gunning, R. V., G. D. Moores & A. L. Devonshire 1996. Esterases and fenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 54, 12-23.
- Gunning, R. V. 1998. Inhibition of resistance-related esterases by piperonyl butoxide in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Hemiptera : Aphididae). In Piperonyl Butoxide, The insecticide synergist. Edited by Denys Glynn Jones. Academic Press Ltd, ISBN 0-12-286975-3., 13, 215-226.
- Gunning, R. V., G. D. Moores & A. L. Devonshire 1998. Esterase inhibitors restore

pyrethroid susceptibility in Australian *Helicoverpa armigera*. In *World Cotton Research Conference 2*. September 6 – 12, 1998 Athens- Greece

Gunning, R. V., G. D. Moores & A. L. Devonshire 1999. Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Pest. Biochem Physiol.*, 63, 52-62.

Gunning, R. V., 2002. *Heliothis* insecticide resistance continues to climb. *Australian Cottongrower*, 23, 71-72.

Gunning, R. V. & M. E. Balfe 2003. Spinosad resistance in Australian *Helicoverpa armigera*. In *World Cotton Research Conference 3*, Capetown, South Africa, 9-13 March 2003.

Hama, H. & T. Iwata 1978. Studies of the inheritance of carbamate-resistance in the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Hemiptera : Cicadellidae). Relationships between insensitivity of acetylcholinesterase and cross-resistance to carbamate and organophosphate insecticides. *Appl. Ent. Zool.*, 13, 190-202.

Hardwick, D. F., 1965. The corn earworm complex. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 40, 1-247.

Head, D. J., A. R. McCaffery & A. Callaghan 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in *Heliothis* lepidoptera. *Insect Mol. Biol.*, 7, 2, 191-196

Horowitz, A. R., I. M. Seligman, G. Forer, D. Bar & I. Ishaaya 1993. Preventive insecticide resistance management strategy in *Helicoverpa (Heliothis) armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in Israeli cotton. *J. Econ Entomol.*, 86, 205-212.

Ibrahim, S. A. & J. A. Ottea 1995. Biochemical and toxicological studies with laboratory and field populations of *Heliothis virescens* (F.), *Pestic Biochem Physiol.*, 53, 116-128.

Javed, N., & G. D. Moores 2003. Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in *Helicoverpa armigera*. In *Proceedings of World Cotton Research Conference 3 Cape Town, South Africa*, 9-13 March 2003 (in press).

Kathary, A., A. Djintho & P. Prudent 1999. Projet régional de gestion de la résistance de *Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoides. Rapport annuel de la Direction Coton et Fibres, République du Bénin. In 1^{ère} réunion du PR-PRAO du 17 au 19 mars 1999 à Bobodioulasso, Burkina Faso

Kennaugh, L., D. Pearce, J. C. Daly & A. A. Hobbes 1993. A Pbo synergisable resistance to permethrin in *Helicoverpa armigera* which is not due to increased detoxification by cytochrome P450. *Pestic Biochem Physiol.*, 45, 234-241.

- Kono, Y., Y. Sato & Y. Okada 1983. Activation of an O-ethyl S-n-propyl phosphorothiolate TIA-230 in the central nerve of spodoptera larvae. *Pest. Biochem. Physiol.*, 20, 225-231.
- Kozioł, F. S. & J. F. Witkowski 1982. Synergism studies with binary mixtures of permethrin plus methyl parathion, chlorpyrifos, and malathion on European corn borer larvae. *J. Econ. Entomol.*, 75, 28-30.
- Kranthi, K. R., N. J. Armes, N. G. V. Rao, S. Raj & V. T. Sundaramurthy 1997. Seasonal dynamics of metabolic mechanisms mediating pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* in central India, *Pestic. Sci.*, 50, 91-98.
- Kranthi, K. R., D. R. Jadhav, S. Kranthi, R. R. Wanjari, S. S. Ali and D. A. Russel 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Protection*, 21, 449-460.
- Kulkarni, A. P. & E. Hodgson 1980. Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems. *Pharmacol. Ther.*, 8, 379-475.
- Kyomura, N. & Y. Takahashi 1979. Joint insecticidal effect of N-propyl and N-methylcarbamates on the green rice leafhopper, resistant to N-methylcarbamates. *J. Pest. Sci.*, 4, 401-409.
- Lee, K. S., C. H. Walker, A. McCaffery, M. Ahmad & E. Little 1989. Metabolism of trans-cypermethrin by *Heliothis armigera* and *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 34, 49-57.
- Leeper, J. R., R.T. Roush & H. T. Reynolds 1986. Preventing or managing resistance in arthropods, In *Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management, populations, Committee on strategies for the management of pesticide resistance pest populations (ed). National Academy Press, Washington, D.C.*, 335-346.
- Li, X., M. R. Berenbaum & M. A. Schuler 2000. Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30, 75-84.
- Loewe S. 1957. Antagonism and antagonists. *Pharmacol. Rev.*, 9, 237-242.
- Lund, A. E. & T. Narahashi 1983. Kinetics of Sodium Channel Modification as the Basis for the Variation in the Nerve Membrane Effects of Pyrethroids and DDT Analogs. *Pestic. Biochem. & Physiol.*, 20, 203-216.
- McCaffery, A. R., G. M. Maruf, A. J. Walker & K. Styles 1988. Resistance to pyrethroids in *Heliothis* spp. : Bioassay methods and incidence in populations from India and Asia. *Brighton Crop Protection Conference – pests and diseases -*, 433-438.
- McCaffery, A. R., A. B. S. King, A. J. Walker & H. El-Nayir 1989. Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm *Heliothis armigera* from Andhra Pradesh, India. *Pestic. Sci.*, 27, 65-76.

- McCaffery, A. R., A. J. Walker & C. P. Topper 1991. Insecticide resistance in the bollworm *Heliothis armigera* from Indonesia. *Pestic. Sci.*, 31, 41-52.
- McCaffery, A. R., D. Head, J. Tan, A. A. Dumbledam, V. R. Subramaniam & A. Callaghan 1995. Nerve insensitivity resistance to pyrethroid in heliothine Lepidoptera, *Pestic. Sci.*, 44, 237-247.
- McCaffery, A. R. 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 1735-1750.
- Martin, T. & P. Jacquemard 1991. Mesure de la sensibilité de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) et *Heliothis armigera* (Hübner) vis à vis du fenvalerate, de cinq organophosphorés et de leurs associations. *Cot. Fib. Trop.*, 46, 5-13.
- Martin, T. & A. Renou 1995. Evolution of tolerance against chemical insecticides in two species of cotton bollworms. *Mededelingen Faculteit Landboukundige en Toegepaste Biologische. Congrès de Gent, Belgique*, 953-959.
- Martin, T. 1997. Projet de suivi régional de la sensibilité d'*Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoïdes et de prévention de la résistance. In *Actes des journées coton du CIRAD-CA - Montpellier 1997*, 12, 138-144.
- Martin, T., O. G. Ochou & F. Hala N'Klo 1999. Une stratégie pour gérer la résistance de *Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoïdes en Côte d'Ivoire : Une fenêtre en phase végétative. *Communication pour la réunion de Bobodioulaso, Burkina Faso du 17 au 19 mars 1999*.
- Martin, T., G. O. Ochou, N. F. Hala, J.-M. Vassal & M. Vaissayre 2000. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa. *Pest Management Sci.*, 56, 549-554.
- Martin, T., F. Chandre, O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2002a. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pest. Biochem. Physiol.*, 74, 17-26.
- Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2002b. Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 16-19.
- Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003a. Organophosphorus insecticides synergise pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa *J. Econ. Entomol.*, 96, 2, 469-474.
- Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003b. Monitoring of the insecticides resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) from 1998 to 2002 in Côte d'Ivoire, West Africa.

Resistance Pest Management Newsletter, 12, 2, 51-55.

Martin, T., O. G. Ochou, M. Vaissayre & D. Fournier 2003c. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hübner) to triazophos in West Africa *Insect Biochem Mol. Biol.* 33, 883-887.

Martin, T., O. G. Ochou, A. Djihinto, D. Traore, M. Togola, M. Vaissayre & D. Fournier 2003d. Insecticide Resistance Management succeeds in controlling pyrethroid resistant bollworm populations in West Africa. *Agriculture Ecosystems and Environment*, (soumis)

Matsumura, F., 1983. Penetration, binding and target insensitivity as causes of resistance to chlorinated hydrocarbon insecticides. In *Pest resistance to pesticide*, edited by G. P. Georgiou and T. Saito, Plenum press New York and London, 367-386.

Matthews, G. A. & J. P. Tunstall 1968. Scouting for pests and timing of spray applications. *Cotton Growing Review*, 45, 115-127.

Mayer, R. T., J. W. Jermyn, M. D. Burke & R. A. Prough 1977. Methoxyresorufin as a substrate for the fluorometric assay of insect microsomal o-dealkylases, *Pest. Biochem. Physiol.*, 7, 349-354.

Michael, P. J., 1989. Importation and establishment of new natural enemies of *Heliothis* spp. (Lep. : Noctuidae) in Australia. In King E.G. and Jackson R. D. (Ed.) *Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis*, Ferro, USDA, NewDehli, India, 363-374.

Montaldo, T., 1991. La lutte microbiologique en culture cotonnière au Nord Cameroun : Synthèse de l'expérimentation menée de 1979 à 1988. *Cot. Fib. Trop.*, 46, 217-229.

Moreira, C. M., 2002. Caractérisation de la résistance d'*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lépidoptère, Noctuidae) au Sénégal par bioessai et méthodes moléculaires. *Rapport de fin d'étude*, Faculte Universitaire des Sciences Agronomiques B-5030 Gembloux, Belgium, pp 102.

Nibouche, S., 1992. Programme coton, rapport de la section phytosanitaire, campagne 1991. Bobo-Dioulasso, INERA, *Document interne INERA/CIRAD*, pp 34.

Nibouche, S., 1993. Programme coton, rapport de la section phytosanitaire, campagne 1992. Bobo-Dioulasso, INERA, *Document interne INERA/CIRAD*, pp 41.

Nibouche, S. 1994. Cycle évolutif de *Helicoverpa armigera* (Hübner) dans l'ouest du Burkina Faso. *Thèse de Doctorat*, 15/12/1994. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, France, pp.143.

Nibouche, S., G. Faure, P. Kleene & S. Ouedraogo 1998. First step toward integrated pest management on cotton in Burkina Faso. *Crop Prot.*, 17, 697-701.

Nibouche, S., J. Beyo & T. Brevault 2003. Modèle de voracité. In *Composante innovations techniques pour la culture cotonnière*, Projet PRASAC Document interne CIRAD, 31-37.

- Nyambo, B. T., 1988. Significance of host-plant phenology in the dynamics and pest incidence of the cotton bollworm, *Heliothis armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), in Western Tanzania. *Crop Prot.*, 7, 161-167.
- Ochou, O. G. & M. Vaissayre 1989. Une stratégie nouvelle de lutte pour la protection phytosanitaire du cotonnier en Côte d'Ivoire. Perspectives et limites des applications sur seuil. *Actes de la 1^{ère} Conférence sur la recherche Cotonnière, Cirad Montpellier*, 385-398.
- Ochou, O. G., Martin T. & N. F. Hala 1998a. Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, West Africa, *In World Cotton Research Conference No. 2 September 6-12, 1998 Athens, Greece*, 833-837.
- Ochou, G. O., G. A. Matthews & J. D. Mumford 1998b. Comparison of different strategies for cotton insect pest management in Africa. *Crop Protection*, 17, 735-741.
- Ochou, O. G., T. Martin & N. F. Hala 1998c. Rapport annuel d'activité, section entomologie coton, station de recherche coton de Bouaké, Côte d'Ivoire, *Document interne, IDESSA/CIRAD*.
- Ochou, O. G., T. Martin & N. F. Hala 1999a. Evaluation d'une stratégie de prévention de la résistance *Helicoverpa armigera* (Hübner) aux pyréthrinoides en culture cotonnière de Côte d'Ivoire. Interventions sur seuil pour renforcer la protection sur calendrier. In 1^{ère} réunion du PR-PRAO du 17 au 19 mars 1999 à Bobodioulasso, Burkina Faso
- Ochou, O. G., T. Martin & N. F. Hala 1999b. Etude des variations géographiques, annuelles et saisonnières de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera : Noctuidae). Implications agronomiques en culture cotonnière de Côte d'Ivoire. In 1^{ère} réunion du PR-PRAO du 17 au 19 mars 1999 à Bobodioulasso, Burkina Faso
- Ochou, O. G., T. Martin & N. F. Hala 1999c. Evaluation d'une stratégie d'intervention sur seuil pour gérer les populations de *Helicoverpa armigera* (Hbn) en culture cotonnière de Côte d'Ivoire. In 1^{ère} réunion du PR-PRAO du 17 au 19 mars 1999 à Bobodioulasso, Burkina Faso
- Ochou O. G., M. Y. Minhibo & T. Martin 2001a. Les traitements sur seuils contre les ravageurs du cotonnier : Bilan de la première phase de vulgarisation. In 3^{ème} réunion du PR-PRAO, mars 2001, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.
- Ochou O. G., R. Dangbenon & T. Martin 2001b. Dynamique des Populations des Principaux Lépidoptères Ravageurs du Cotonnier en Côte d'Ivoire. In 3^{ème} réunion du PR-PRAO, mars 2001, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire.
- Ochou, O. G. & T. Martin 2002. Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner): Recent Developments and Prospects for its Management in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 10-16.

- Ochou, O. G. & T. Martin 2003. Activity spectrum of Spinosad and Indoxacarb: Rational for a differential resistance management strategy in West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 2, 75-81.
- Omura, T. & R. Sato 1964. The carbon dioxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378.
- Ottea, J. A., A. M. Younis, S. A. Ibrahim, R. J. Young, B. R. Leonard & A. R. McCaffery 1995. Biochemical and physiological mechanisms of pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* (F.). *Pestic Biochem Physiol.*, 51, 117-128.
- Park, Y, M. F. J. Taylor & R. Feyereisen 1997. A valine421 to methionine mutation in IS6 of the hscp voltage-gated sodium channel associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* F. *Bioch. Bioph. Res. Comm* 239, 688-691.
- Parsons, F. S., 1939. Investigations on the cotton bollworm, *Heliothis armigera*, Hbn.(*obsleta*, Fabr.). *Bull. Entomol. Res.*, 30, 321-337.
- Parsons, F. S., 1940. Investigations on the cotton bollworm, *Heliothis armigera*, Hbn. *Bull. Entomol. Res.*, 31, 147-177.
- Patil, T. N., R. A. Morton & R. S. Singh 1990. Characterisation of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase from malathion resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.*, 20, 91-98.
- Pauly, G. & M. Vaissayre 1980. Etat actuel des travaux de sélection sur les caractères de résistance du cotonnier aux chenilles de la capsule en Afrique Centrale. *Cot. Fib. Trop.*, 25, 209-216.
- Pimprale, S. S., C. L. Besco, P. K. Bryson & T. M. Brown 1997. Increased susceptibility of pyrethroid-resistant tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorfenapyr. *J. Econ. Entomol.* 90, 49-54.
- Pittendrigh, B., K. Aronstein, E. Zinkovsky, O. Andreev, B. Cambell, J. Daly, S. Trowell & R. Ffrench-Constant 1997. Cytochrome P450 genes from *Helicoverpa armigera*: expression in a pyrethroid-susceptible and -resistant strain. *Insect. Biochem Molec. Biol.*, 27, 507-512.
- Plackett, R. L., & P. S. Hewlett 1967. A comparison of tow approaches to the construction of models for quantal responses to mixtures of drugs. *Biometrics*, 27-45.
- Poirié, M. & N. Pasteur 1991. La résistance des insectes aux insecticides. *La Recherche*, 234, 874-882.
- Poitout, S. & R. Bues 1979. La noctuelle de la tomate (*Heliothis* ou *Helicoverpa armigera* Hbn.). Son cycle évolutif dans le sud de la France. *La défense des Végétaux*, 195, 12-28.

- Ranasinghe, C., & A. A. Hobbs 1999. Isolation and characterisation of a cytochrome b5 cDNA clone from *Helicoverpa armigera* (Hübner): possible involvement of cytochrome b5 in cytochrome P450 CYP6B7 activity towards pyrethroids. *Insect. Biochem Molec. Biol.*, 29, 145-151.
- Raymond, G., 1998. Les intrants agricoles en Afrique Zone Franc. AOCA / RSP-GRN Symposium septembre 1998, Bamako, Mali.
- Reed, W., 1965. *Heliothis armigera* (Hüb.) (Noctuidae) in western Tanganyika. I. Biology, with special reference to pupal stage. *Bull. Entomol. Res.*, 56, 117-125.
- Reed, W. & C. S. Pawar 1982. *Heliothis* : a global problem. In Reed (Ed.) *Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management, ICRISAT, Patancheru, Inde*, 9-14.
- Renou, A. & M. Vaissayre 1979. Détermination in vitro de la toxicité de quelques matières actives insecticides vis à vis des chenilles de la capsule *Diparopsis watersi* (Roth.) et *Heliothis armigera* (Hbn) (Lepidoptères Noctuidae). *Congrès sur la protection des cultures tropicales. Chambre de Commerce et d'Industrie de Marseille, 13-16 août 1979, Marseille*, 83-95.
- Renou, A. & T. Martin 1990. Rapport annuel d'activité, section entomologie coton, station de Bebedjia, Tchad. *Document interne CIRAD*, pp 90.
- Renou, A. & T. Martin 1991. Rapport annuel d'activité, section entomologie coton, station de Bebedjia, Tchad. *Document interne CIRAD*, pp 119.
- Renou, A. & T. Martin 1992. Rapport annuel d'activité, section entomologie coton, station de Bebedjia, Tchad. *Document interne CIRAD*, pp 70.
- Robertson, J. L. & K. C. Smith. 1984. Joint action of pyrethroid with organophosphorus and carbamate insecticides applied to western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.*, 77, 16-22.
- Rose, H. A. & B. E. Wallbank 1986. Mixed function oxidase and glutathione S-transferase activity in a susceptible and a fenitrothion-resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera : Cucujidae). *J. Econ. Entomol.*, 79 : 896-899.
- Rose, R. L., D. Goh, D. M. Thompson, K. D. Verma, D. G. Heckel, L. J. Gahan, R. M. Roe & E. Hodgson 1997. Cytochrome P450 (CYP)9A1 in *Heliothis virescens* : the first member of a new CYP family. *Insect. Biochem Molec. Biol.*, 27, 605-615
- Sabourault, C., V. M. Guzov, J. F. Koener, C. Claudianos, F. W. Jr Plapp and R. Feyereisen 2001. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdxE7) gene in resistant house flies. *Insect Mol. Biol.*, 10, 609-618.
- Sawicki, R., 1987. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. In Ford

- M.G., Holloman D.W., Khambari B.P.S. & Sawicki R.M. (Eds) *Combating resistance to xenobiotics: biological and chemical approaches*. Ellis Horwood, Chichester, U.K., pp 105-117.
- Scott, J. G. 1999. Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 29, 757-777.
- Shen, J., J. Tan, B. Zhou, C. Jin & F. Tan 1992. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera : Noctuidae) in China. *Resist. Pest. Manag.*, 4, 22-24.
- Silvie, P., J.P. Deguine, S. Nibouche, B. Michel & M. Vaissayre 2001. Potential of threshold-based interventions for cotton pest control by small farmers in West Africa. *Crop Prot.*, 20, 297-301.
- Sun, Y.-P. & E. R. Johnson 1960. Analysis in joint action of insecticides against house flies. *J. Econ. Entomol.*, 53, 887-892.
- Topper, C. P., 1987. The dynamics of adult population of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) within the Sudan Gezira in relation to cropping pattern and pest control in cotton. *Bull. Entomol. Res.*, 77, 525-539.
- Torres-Villa, L.M., M.C. Rodriguez-Molina, A. Lacasa-Plasencia, P. Bielza-Lino & A. Rodriguez-del-Rincon, 2002. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain : current status and agroecological perspective. *Agri. Ecosyst. Environ.*, 93, 55-66.
- Traore, D., O. Hema & O. Ilboudo 1999. Projet régional de gestion de la résistance de *Helicoverpa armigera* aux pyréthrinoides. Rapport annuel INERA, Burkina Faso. In 1^{ère} réunion du PR-PRAO du 17 au 19 mars 1999 à Bobodioulasso, Burkina Faso
- Vaissayre, M. & J. Lucas-Chauvelon 1989. Toxicité de diverses associations entre pyréthrinoides et organophosphorés vis à vis d'*Helicoverpa armigera* Hbn, In *Proc. 1st African Cotton Research Conference*, vol. 2, Lomé, Togo, January 31- February 2, 357-360.
- Vaissayre, M., J.-M. Vassal, C. Staetz & S. Irving 2002. A Vial Test Method for the Survey of Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* in West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 20-22.
- Van Jaarsveld, M. J., N. C. J. Basson & P. Marais 1998. Synthetic pyrethroid resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) in South Africa. *African Plant Protection*, 4, 15-18.
- Vassal, J.-M., M. Vaissayre & T. Martin 1997. Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. *Resist. Pest. Manag.*, 9, 14-15.
- Villatte, F., D. Auge, P. Touton, R. Delorme & D. Fournier 1999. Negative Cross-

- insensitivity in insecticide-resistant cotton aphid *Aphis gossypii*. *Pest. Biochem Physiol.*, 65, 55-61.
- Webb J. L. 1963. Effect of more than one inhibitor. In *Enzyme and metabolic inhibitors*. Academic press, New York, USA, 66-79.
- West, A. J. & A. R. McCaffery 1992. Evidence for nerve insensitivity to cypermethrin from Indian strains of *Helicoverpa armigera*, In *Proc. Brighton Crop Protect. Conference: Pests and Diseases*. The British Crop Protection Council, Farnham, UK, 233-238.
- Wilson, A. G. L., 1983. Abundance and mortality of overwintering *Heliothis* spp. *Journal of the Australian Entomological Society*, 22, 191-199.
- Zhao, G., R. L. Rose, E. Hodgson & R. M. Roe 1996. Biochemical mechanism and diagnostic microassays for pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticide resistance / cross-resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem Physiol.*, 56, 183-195.
- Zhu, K. Y. & M. Clark 1994. Comparisons of kinetic properties of acetylcholinesterase purified from azinphosmethyl-susceptible and resistant strains of Colorado potato beetle. *Pest. Biochem Physiol.*, 51, 57-67.

PHOTOS

Photo 1 : *H. armigera* et ses principales plantes hôtes en Côte d'Ivoire)

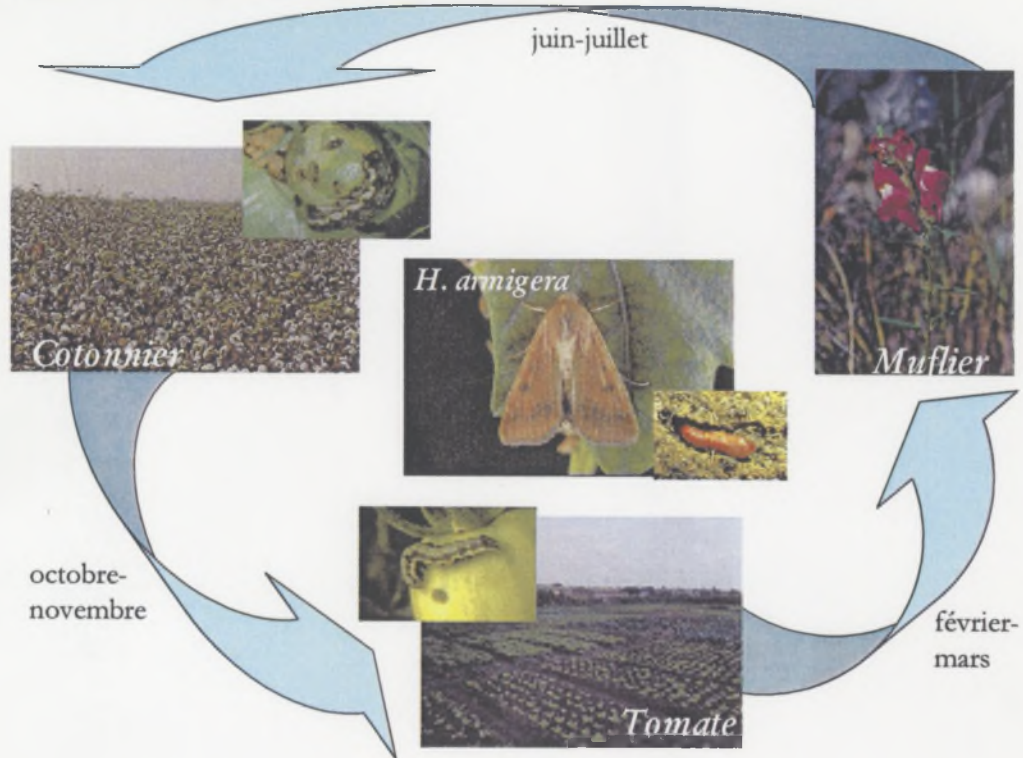


Photo 2 : Carte de la Côte d'Ivoire avec les zones cotonnières en hachuré et carte de l'Afrique

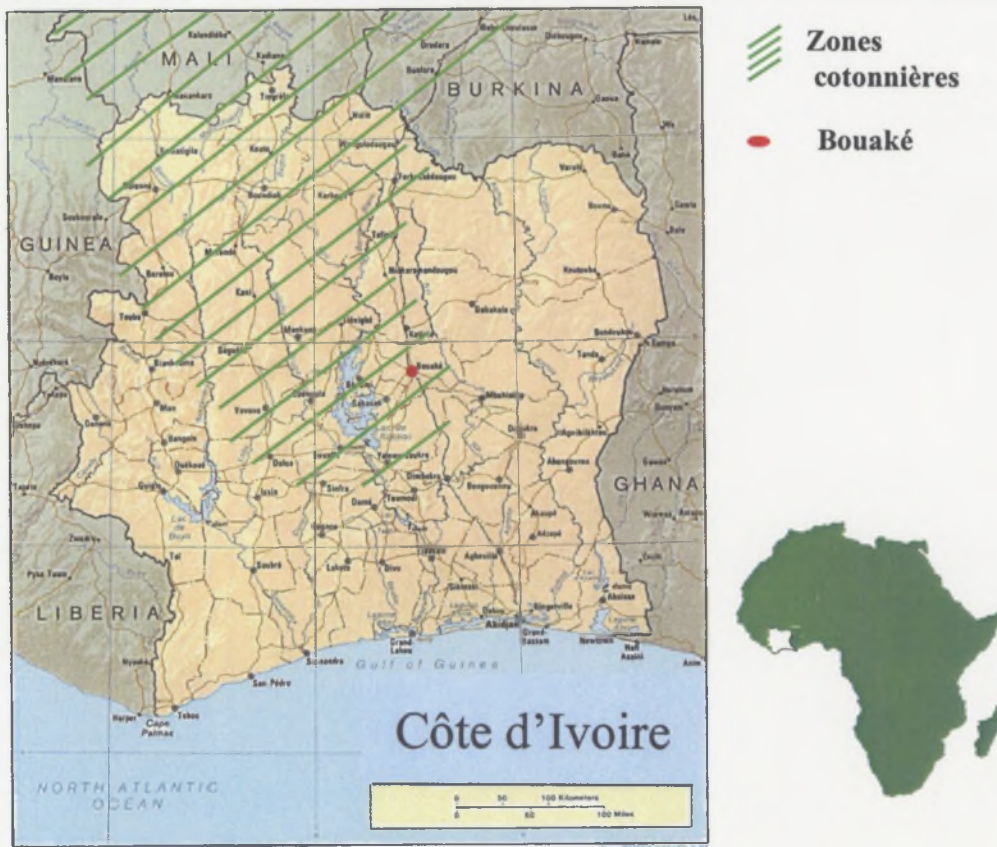


Photo 3 : Stratégie de gestion de la résistance recommandée pour la culture cotonnière en Côte d'Ivoire

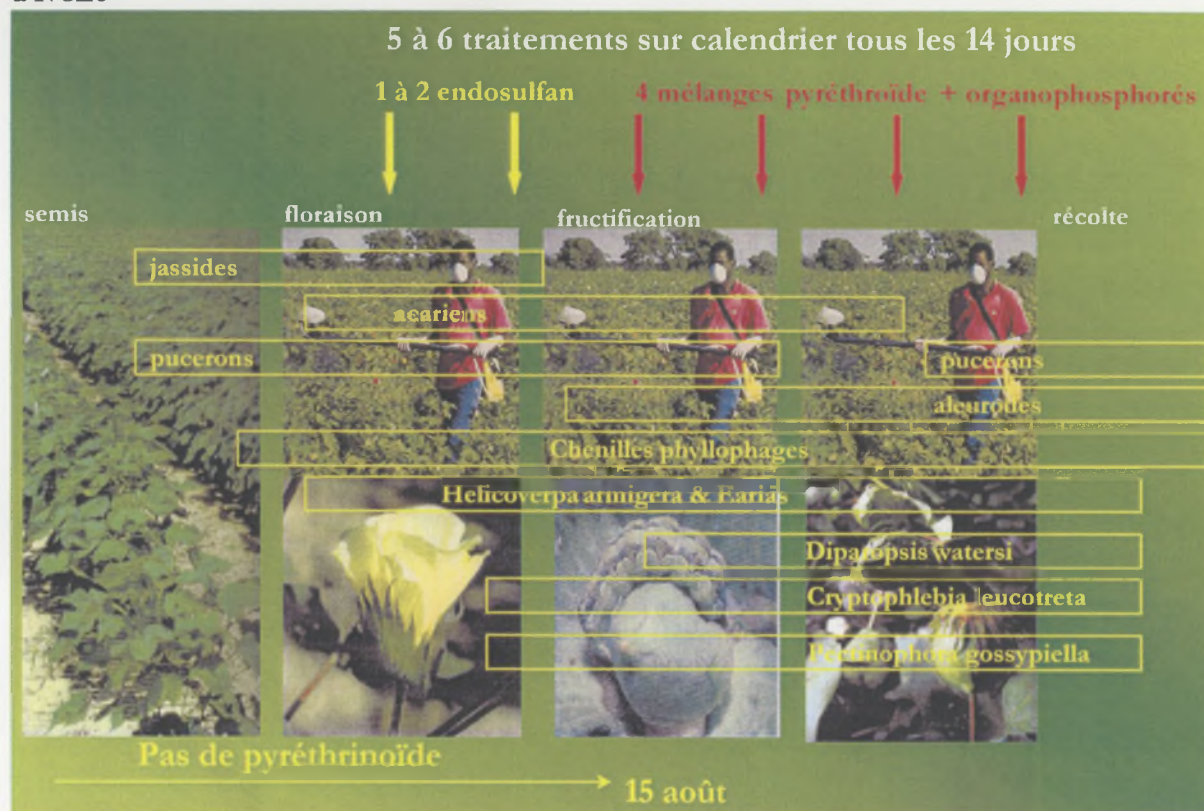


Photo 4 : Cette ardoise est un outil d'aide à la décision destinés aux planteurs de coton de Côte d'Ivoire pour déclencher les traitements en fonction de la présence des ravageurs

PROTECTION DU COTONNIER SUR SEUIL EN CÔTE D'IVOIRE-PHASE I

OBSERVER 30 PLANTS PAR GROUPES DE 5 PLANTS CONSECUTIFS

		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Seuil : 10 plants atteints Produit : Endosulfan ou Profenofos 2 boîtes/ha
Plants atteints par les jassides			
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Seuil : 10 plants atteints Produit : Endosulfan ou Profenofos 2 boîtes/ha
Plants atteints par les pucerons			
		1 2	Seuil : 2 foyers scarabés Produit : Endosulfan ou Profenofos 2 boîtes/ha
Foyers de Plants scarabés			
		1 2 3	Seuil : 3 plants atteints Produit : Endosulfan ou Profenofos 2 boîtes/ha
Plants atteints par des chenilles phyllophages			
		1 2 3	Seuil : 3 chenilles Produit : Endosulfan ou Profenofos 4 boîtes/ha
Chenilles des boutons floraux, des fleurs et des capsules			
DECISION EN FONCTION DU NIVEAU D'INFESTATION		→ Ne pas traiter	→ Traiter

ANNEXES

Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), in West Africa

Thibaud Martin,^{1,2} Germain O Ochou,¹ François Hala-N'Klo,¹ Jean-Michel Vassal² and Maurice Vaissayre^{2*}

¹CNRA, Cotton Research Center, 01 BP 633 Bouaké, Côte d'Ivoire

²CIRAD-CA, BP 5035 34032, Montpellier, France

Abstract: The susceptibility of *Helicoverpa armigera* to pyrethroids has been investigated in West Africa by means of laboratory bioassays since 1985, the first year of widespread pyrethroid use. For some years, this survey has shown a tendency for the pest to become more tolerant to pyrethroids. During the 1996 growing season, farmers using calendar-based spraying programmes reported control failures in various countries. The strong efficacy of cypermethrin on small larvae was confirmed in experimental plots, but the effect decreased quickly in successive instars. Bioassays performed on resistant strains revealed an increase in LD₅₀ that was related to different resistance mechanisms. Metabolic resistance (MFO) appears to be a possible primary mechanism of resistance to pyrethroids. Target modification (*kdr*) is involved to a small degree and esterases seem to appear only after additional selection pressure.

© 2000 Society of Chemical Industry

Keywords: *Helicoverpa*; pyrethroids; resistance; resistance mechanisms; West Africa

1 INTRODUCTION

The bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) is one of the main pests observed on cotton, together with the false codling moth *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) and the broad mite *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) in Benin and Côte d'Ivoire and jassids and bugs in Mali and Burkina Faso. Aphids, whitefly and leaf-eating caterpillars (*Anomis flava* F and *Syllepta derogata* F) were until recently considered as secondary pests. *H. armigera* infestations in West Africa are erratic in both time and space but certain trends can be seen. The first generation appears in mid-July during square formation in early sowings. Pest incidence partly depends on weather factors since heavy, continuous rainfall reduces insect numbers. The most serious infestations occur in September and October, causing more severe damage to late-sown crops.

Management guidelines for the cotton pest complex in West Africa were designed to provide small growers with simple, safe and inexpensive calendar-based spraying recommendations. Once started, usually at squaring, the sprayings (from four to six) are applied irrespective of the pest status or level of infestation. The formulations used combine a pyrethroid (usually cypermethrin) for the control of bollworms and an organophosphate to control other members of the pest complex and to enhance the effectiveness of pyrethroids on bollworms.¹ Such a mixture has been found to have a distinct effect on yield and on *H. armigera*.²

The above approach has been used on more than

1.8 million ha in West Africa for many years and has led to a reasonable level of control of cotton pests without eliciting measurable resistance, despite being totally different from IRM strategies developed in Australia and Zimbabwe.³ No control failures were reported on cotton in any countries in French-speaking Africa operating this scheme until 1994,⁴ but a rise in LD₅₀ values was recorded in Côte d'Ivoire from 1996 onwards for both cypermethrin and deltamethrin in some *H. armigera* populations. The LD₅₀ values recorded in 1997 were 20 and 10 times higher than the mean LD₅₀ from 1985 to 1992 for cypermethrin and deltamethrin respectively.⁵ During the same period, pyrethroid resistance in *H. armigera* was well documented in Australia,⁶ Thailand,⁷ India,⁸ Indonesia,⁹ China,¹⁰ Pakistan¹¹ and South Africa.¹²

Nerve insensitivity has often been shown to be the main pyrethroid resistance mechanism in mosquitoes and houseflies.¹³ Studies of pyrethroid resistance in *H. armigera* in Australia, China and India showed the dominance of oxidative metabolic mechanisms.¹⁴ In the light of these results, we set out to determine whether a *kdr* mechanism and/or metabolic detoxification might be involved in *H. armigera* pyrethroid resistance in Côte d'Ivoire.

2 EXPERIMENTAL METHODS

The susceptibility of bollworms to commercial products has been monitored in the laboratory of the

* Correspondence to: Maurice Vaissayre, CIRAD-CA, BP5035 34032. Montpellier, France

E-mail: maurice.vaissayr@cirad.fr

(Received 14 December 1998; revised version received 15 December 1999; accepted 21 January 2000)

cotton research center in Bouaké (Côte d'Ivoire) since 1985. Methods based on FAO recommendations¹⁵ were devised to detect any change in the susceptibility of *H armigera* to pyrethroids before any report of loss in effectiveness at field level.

2.1 Insects

Cotton is grown from June to November in West Africa and three generations of the bollworm are observed on flowering cotton plants from late July to mid-October, according to the sowing date. During this period, cotton is the only sprayed crop. In the cool dry season (from December to February), *H armigera* develops on vegetables where numerous pyrethroid sprayings are applied for its control. The bollworm must migrate or diapause in order to survive during the hot dry season (from March to May).

H armigera larvae were collected from unsprayed plots in Bouaké or from farmers' fields in the north in the first week of October (highest infestation peak and the last *H armigera* generation developing on cotton). The bollworm larvae were reared on artificial diet at 25°C and 85% relative humidity.¹⁶

The strains were identified as follows:

Bké 77: a susceptible strain collected in 1977 at Bouaké, Côte d'Ivoire. It is currently reared in the CIRAD laboratories in Montpellier, France. It has never been exposed to a pyrethroid and is considered as a control for resistance studies.

Bké 92 to 97: strains collected in October on the Research Center experimental plots at Bouaké. Bké 96 was kept under selection pressure (deltamethrin) for four successive generations.

Nka 96: a strain collected from mid-September to early October in farmers' fields near Niakara, 150 km north of Bouaké.

Nbg 97: a strain collected from mid-September to early October in farmers' fields near Nambingué, 250 km north of Bouaké.

Tests were performed on the first generation (F1) of the Bké strains (except for Bké 96) and on the third generation (F3) of the Nka strain. For insecticide application, five-day-old larvae were weighed individually (25 to 35 mg). They were kept individually in 24-cell boxes.

2.2 Insecticides and synergists

The technical grade insecticides used in the bioassays were: cypermethrin (98%) Calliope, Noguères, France; fenvalerate (95.4%) Sumitomo Chemical Co, Osaka, Japan; endosulfan (98.8%) and deltamethrin (98%) Sofaco (AgrEvo), Abidjan, Côte d'Ivoire. The cypermethrin formulation used for leaf applications was a 100 g AI litre⁻¹ EC, Sherpa®, Rhône-Poulenc Agro, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Metabolic resistance, which generally results in the highest levels of resistance, can be demonstrated by

the use of synergists. Two synergists were used in combination with pyrethroids: piperonyl butoxide (PB), and *S,S,S*-tributyl phosphoro-trithioate (DEF). They were applied topically in acetone 30 min before the pyrethroids. Preliminary bioassays were performed using five doses ranging from 200 to 0.02 µg per larva. Only the smallest dose had no effect on susceptibility to deltamethrin in the control strain (Bké 77). This dose was used with both PB and DEF.

2.3 Topical bioassay procedure

The LD₅₀ values of the different strains were determined by topical application. At least five doses (30 insects per dose) of the insecticide were used, leading to between 0 and 100% mortality. Acetone solutions were prepared on the day of the test. One microlitre of solution at 25°C was applied to the thorax of the larva with an Arnold micro-applicator. The control group received 1 µl acetone alone. The insects were then given an artificial diet and placed in individual rearing cells. Mortality was assessed 24, 48, and 72 h after application.

2.4 Foliar application procedure

In 1996, infestation began on 15 October at the Bouaké research center and developed for 10 days on two untreated 400 m² plots (20 rows × 20 m). Egg and larva counts of *H armigera* were performed on 100 plants per plot. The larvae were then separated and classified by size. The categories were: less than 1 cm (L1 and L2), between 1 and 3 cm (L3 and L4) and longer than 3 cm. Sampling was performed before insecticide application and then three days and six days later. A cypermethrin formulation was applied at 40 g AI ha⁻¹ with a knapsack sprayer equipped with an horizontal boom delivering 120 litre ha⁻¹.

2.5 Analysis of results

Results were expressed as µg of active ingredient per gram of insect. The LD₅₀ 4.6 software designed by the CIRAD Biometry Department¹⁷ was used to analyse the data by means of Finney's log-probit method.¹⁸ This software estimates the dosages causing 20%, 50% and 90% mortality with their confidence intervals ($p = 0.05$) and gives the regression line.

3 RESULTS

3.1 Bioassays

The LD₅₀ did not differ significantly in the results for cypermethrin, (overlapping of confidence intervals) from 1987 to 1994 (Fig 1). The mean was 0.23 µg AI g⁻¹ (confidence interval from 0.19 to 0.27). In a bioassay completed in 1992, the susceptibility of the Bké 92 strain was similar to that of Bké 77 strain (control) (Table 1). A slight rise in LD₅₀ occurred in 1993 and 1994 and the change was subsequently more marked in 1995 with an LD₅₀ of 2.59 µg g⁻¹, attaining 5.05 in 1996. This was a significant increase (the

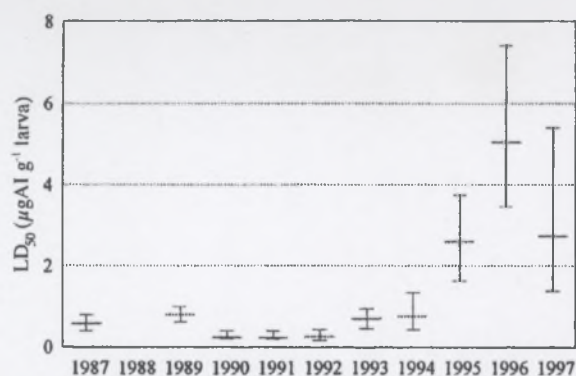


Figure 1. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* to cypermethrin in Côte d'Ivoire (Bar=95% FL).

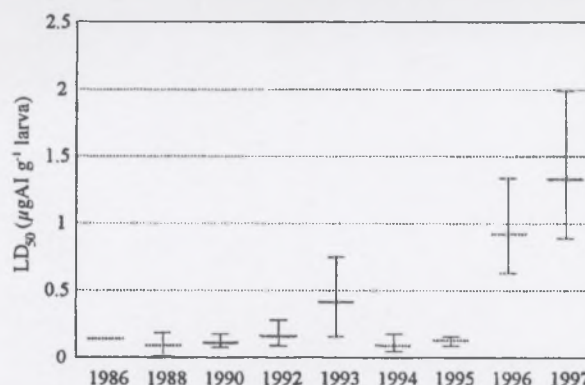


Figure 2. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* to deltamethrin in Côte d'Ivoire (Bar=95% FL).

confidence intervals no longer overlapped) in comparison with the LD_{50} of the susceptible strain.

The LD_{50} of deltamethrin on *H. armigera* was unchanged from 1985 to 1992 (Fig 2). The mean was $0.09 \mu\text{g AI g}^{-1}$ ($0.02\text{--}0.19$). An increase was observed in 1993 but not in the next two years. In 1996, the LD_{50} was $0.92 \mu\text{g g}^{-1}$: this was a 10-fold increase compared with the LD_{50} of the susceptible strain (Table 1). This trend was confirmed in the 1997 strain ($LD_{50} = 1.33 \mu\text{g g}^{-1}$) an increase to 18-fold. In April 1997, the results obtained on strain Bké 77 with deltamethrin were not significantly different from those obtained in 1992 (Table 1).

The slope of the concentration-mortality line changed steadily as resistance increased. It was high for populations up to 1993 and then fell gradually, with no increase in LD_{50} values in 1994 and 1995, indicating a higher number of resistant individuals in the population. Finally, the slope returned towards its original form in the 1996 cotton growing season, after possible elimination of susceptible larvae.¹⁹

In 1996, the susceptibility of the Bouaké strain to pyrethroids was compared to that of a strain from the Niakara area 150 km north of Bouaké. The LD_{50} values were similar (Table 1). Fenvalerate and endosulfan were also tested on the strain Bké 97. Loss of susceptibility was particularly marked for fenvalerate (Table 1). The LD_{50} was 75 times greater than that of the susceptible strain. However, the tests performed with endosulfan (Table 2) did not indicate a significant difference between the Niakara strain and the susceptible strain.

3.2 Foliar application

The results of two foliar treatments with cypermethrin at 40 g AI ha^{-1} on a serious infestation of *H. armigera* are shown in Table 3. There were 335 eggs on 100 plants before the treatment, 126 two days later and 147 six days after treatment. Oviposition ceased before the second treatment. There was no rain during the entire period.

Application on the smaller larvae (first instars)

Table 1. LD_{50} values obtained on third-instar larvae of field and laboratory strains of *Helicoverpa armigera* 72h after topical treatment with pyrethroids

Strain and year of testing	Insecticide	n	LD_{50} (95% FL) $\mu\text{g AI (g larva)}^{-1}$	Resistance factor at LD_{50} ^a	Slope	SE
Bké77 1997	Deltamethrin	144	0.040 (0.023–0.062)	–	1.96	0.85
Bké77 1992	Deltamethrin	150	0.075 (0.056–0.101)	1	1.73	0.29
Bké 1992	Deltamethrin	150	0.160 (0.092–0.280)	2	1.14	0.25
Bké 1994	Deltamethrin	150	0.091 (0.046–0.180)	1.2	0.72	0.15
Bké 1996	Deltamethrin	144	0.920 (0.630–1.340)	12	1.33	0.30
Nka 1996	Deltamethrin	144	0.822 (0.521–1.297)	11	1.50	0.28
Bké 1997	Deltamethrin	144	1.330 (0.890–1.990)	18	1.18	0.18
Bké77 1992	Cypermethrin	150	0.47 (0.38–0.58)	1	2.99	0.47
Bké 1992	Cypermethrin	150	0.27 (0.17–0.44)	0.6	1.51	0.31
Bké 1994	Cypermethrin	175	0.76 (0.43–1.34)	1.6	0.85	0.17
Bké 1996	Cypermethrin	144	5.05 (3.45–7.40)	10	1.46	0.22
Nka 1996	Cypermethrin	142	2.04 (1.24–3.36)	5	1.20	0.19
Bké 1997	Cypermethrin	144	2.73 (1.38–5.40)	5.8	1.14	0.31
Bké77 1992	Fenvalerate	150	0.14 (0.11–0.17)	1	3.21	0.62
Bké 1992	Fenvalerate	150	0.28 (0.10–0.79)	2	0.98	0.27
Nka 1996	Fenvalerate	165	10.4 (6.52–16.7)	75	1.27	0.19

^a LD_{50} Resistant strain/ LD_{50} laboratory susceptible strain (Bké77).

Table 2. LD₅₀ values obtained on third-instar larvae of field and laboratory strains of *Helicoverpa armigera* 72 h after topical treatment with endosulfan

Strain year of testing	Insecticide	n	LD ₅₀ (95% FL) µg AI (g larva) ⁻¹	Resistance factor at LD ₅₀ ^a	Slope	SE
Bké77 1992	Endosulfan	144	26.4 (19.4–35.9)	1	1.88	0.35
Bké 1992	Endosulfan	144	38.2 (29.5–49.3)	1.4	2.71	0.48
Nka 1996	Endosulfan	142	25.0 (19.6–31.9)	0.9	2.50	0.34

^a LD₅₀ Resistant strain/LD₅₀ laboratory susceptible strain (Bké77).**Table 3.** Number of small, medium and large larvae of *Helicoverpa armigera* observed on 100 plants before, three and six days after spraying with cypermethrin at 40 g AI ha⁻¹ (Bouaké 1996)

Date	Observation ^a (100 plts)	Larvae per plant (95% FL)		
		Small	Medium	Large
24 Oct 1996	T1 – 1 day	1.01 (0.79–1.23)	1.26 (0.96–1.56)	0.25 (0.14–0.36)
28 Oct 1996	T1 + 3 days	0.12 (0.04–0.20)	0.89 (0.68–1.10)	0.32 (0.20–0.44)
31 Oct 1996	T1 + 6 days	0.12 (0.06–0.18)	0.35 (0.23–0.47)	0.20 (0.11–0.29)
07 Nov 1996	T2 – 1 day	0.37 (0.19–0.55)	0.53 (0.34–0.72)	0.21 (0.13–0.29)
11 Nov 1996	T2 + 3 days	0.05 (0.01–0.09)	0.45 (0.30–0.60)	0.06 (0.00–0.13)
14 Nov 1996	T2 + 6 days	0.05 (0.01–0.09)	0.37 (0.25–0.49)	0.09 (0.03–0.15)

^a T1 and T2: respectively first and second treatment.

resulted in a reduction of 90% two days after each treatment, with the same level maintained for six days. Control of medium-sized larvae attained 60% six days after the first treatment. The total number of bollworms remained high even after the second treatment. The two applications of cypermethrin did not control the larger larvae.

3.3 Synergists

Various strains of *H. armigera* collected in the field or reared in the laboratory were treated with deltamethrin with and without synergists in an attempt to elucidate some of the resistance mechanisms involved.²⁰ A synergy ratio was then expressed as the ratio of LD₅₀ without synergist/LD₅₀ with synergist (Table 4).

4 DISCUSSION

The results suggest three kinds of situation:

- PB reduced the LD₅₀ of deltamethrin for the strain collected in the field (Nbg 97) to that of the control.

Table 4. Effect of two synergists on LD₅₀ of deltamethrin applied on *Helicoverpa armigera* L3 larvae

PB	LD ₅₀ (µg g ⁻¹ larva)		Synergist ratio
	deltamethrin alone	with PB	
Control (Bké 77)	0.049	0.045	1.1
Bké 96 lab strain	2.26	0.229	10
Bké 97 strain	1.33	0.430	3
Nbg 97 strain	0.89	0.047	19
DEF			
	deltamethrin alone	with DEF	Synergist ratio
Control (Bké 77)	0.049	0.045	1.1
Bké 96 lab strain	2.26	0.320	7
Bké 97 strain	1.66	0.860	1.5
Nbg 97 strain	na ^a		

^a There were insufficient bollworms to test DEF on the Nbg 97 strain.

An MFO-type mechanism is suspected, and seems to be the only significant one involved in deltamethrin resistance in farmers' fields in northern Côte d'Ivoire. This is correlated with observations made in CIRAD's facilities in Montpellier on strains collected in Benin, considered as pyrethroid-resistant but expressing no cross-resistance with DDT.²¹

- DEF did not have a synergistic effect on the strain collected in Bouaké in 1997 and LD₅₀ was still 20 times as high as in the control. On the other hand, LD₅₀ was reduced following 1:3 PB addition but remained 10 times higher than in the control. It seems that this strain expressed two resistance mechanisms, the first being possibly a *kdr*-type, corresponding with the first level of resistance (10-fold for deltamethrin) and the second a MFO-type responsible for a further 3-fold increase in resistance;
- in the strain collected at Bouaké research station in 1996, selection pressure in the laboratory for four generations led to a change in the effect of both synergists (with a SR from 7 to 10), indicating combined MFO and esterase resistance mechanisms.

The results of the present studies show that populations of *H. armigera* from West Africa include individuals with resistance to pyrethroids. This decline in susceptibility to pyrethroids is similar for both cypermethrin (the pyrethroid most widely used on cotton in West Africa) and deltamethrin. Resistance factors for some field strains are currently >5 for cypermethrin and close to 20 for deltamethrin. According to Georgiou and Mellon,²² these levels are sufficient to classify these populations as resistant to pyrethroids and many farmers in West Africa complain of control failures in spite of correct application rates and practices.

In their study on synergists, Forrester *et al*¹⁴ considered 50 µg per larva of PB and DEF as *satis superque* dosages. Gunning *et al*²³ had used a smaller dose (10 µg per larva) for both. In spite of the small amount of synergist used in our experiment (0.02 µg per larva), significant differences appeared between the control and synergised samples.

DDT resistance was present in many countries when pyrethroids were introduced²⁴ and is thought to have facilitated pyrethroid resistance through a target-site cross-resistance mechanism. However, in Côte d'Ivoire, the LD₅₀ obtained with organochlorine compounds on *H. armigera* did not reveal any resistance to this family of insecticides. Synergist studies suggest that the oxidative metabolism (MFO) resistance mechanism is predominant in the resistant field strains of *H. armigera*. If this is confirmed by detailed metabolic studies, the situation resembles that previously observed in Australia.¹⁴ The absence of cross-resistance to DDT when pyrethroids were introduced may partly explain why resistance to pyrethroids has been slow to appear in West Africa.

The experiments performed in the field indicated that cypermethrin was effective against first- and second-instar larvae, eliminating approximately 90%. However, medium-sized bollworms were more difficult to control and there was a total lack of effectiveness in the control of larger larvae. These results are comparable to those obtained in Australia.²⁵ In such a situation, it is recommended that pyrethroid applications should be targeted on the more susceptible younger instars instead of increasing insecticide dosage in an attempt to control larger larvae.

The CNRA laboratory has achieved its objective in trying to detect any development of resistance before noting a loss of effectiveness at a regional level. The prevention and management of pyrethroid resistance requires measures, some of which have already been implemented (pesticide mixtures, pyrethroid-free windows). Others are being developed (threshold-based applications) in six countries in West Africa.

Synergists could be used in resistance management strategies, but successful use in the field is not easily achieved. Forrester *et al*¹⁴ showed that the use of synergists on insecticide-resistant *H. armigera* in the field is not very effective, mainly because of the development of new resistance to the synergised insecticide. Ideally, several synergists should be available commercially and alternated during the season. The confirmed existence of multiple mechanisms in some strains also negates the use of synergists for overcoming metabolic resistance and so there is a need to use insecticides with novel modes of action, together with pyrethroids and organophosphates, in a co-ordinated management strategy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank AgrEvo and Rhône-Poulenc Agro for providing the laboratory equipment.

REFERENCES

- 1 Vaissayre M, Development of pyrethroid-organophosphate associations for cotton pest control in French-speaking Africa, in *1985 Proc Beltwide Cotton Conferences*, New Orleans, LA, USA, 6–11 January, 1985. pp 127–129 (1985).
- 2 Vaissayre M and Lucas-Chauvelon J, Toxicité de diverses associations entre pyrèthrinoides et organophosphorés vis à vis d'*Helicoverpa armigera* Hbn, in *Proc. 1st African Cotton Research Conference*. Vol 2. Lomé, Togo, 31 January–2 February 1989. pp 357–360 (1980).
- 3 Sawicki RM and Denholm I, Management of resistance to pesticides in cotton pests. *Trop Pest Management* 33:262–272 (1987).
- 4 Vaissayre M, Monitoring the sensitivity to pesticides in some cotton pests in francophone Africa and Madagascar. *Resist Pest Manag* 6/2:6 (1994).
- 5 Vassal JM, Martin T, Hala Nklo F, Ochou OG and Vaissayre M, Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Cote d'Ivoire, in 'Resistance '97 – Integrated approach to combating resistance'. IACR, Rothamsted, Harpenden, Herts, UK Poster session (1997).
- 6 Gunning RV, Easton CS, Greenup LR and Edge VE, Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* in Australia. *J Econ Entomol* 77:1283–1287 (1984).
- 7 Ahmad M and McCaffery AR, Resistance to insecticides in a Thailand strain of *Heliothis armigera* Hübner. *J Econ Entomol* 81:45–48 (1988).
- 8 McCaffery AR, King ABS, Walker AJ and El-Nayir H, Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm, *Heliothis armigera* from Andhra Pradesh, India. *Pestic Sci* 27:65–76 (1989).
- 9 McCaffery AR, Walker AJ and Topper CP, Insecticide resistance in the bollworm, *Helicoverpa armigera* from Indonesia. *Pestic Sci* 32:85–90 (1991).
- 10 Shen J-L, Yu Y-D, Tan J-G and Tan F-J, Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* in China. *Resist Pest Manag* 4:22–24 (1992).
- 11 Ahmad M, Arif MI and Ahmad Z, Monitoring insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* in Pakistan. *J Econ Entomol* 88:771–776 (1995).
- 12 van Jaarsveld MJ, Resistance of the American bollworm (*Heliothis armigera*) to synthetic pyrethroids. *Plant Prot News* 35:1–2 (1994).
- 13 Brattsen LB, Holyoke CW, Leeper JR and Raffa KF, Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research, *Science (Washington)* 231:1255–1260 (1986).
- 14 Forrester NW, Cahill M, Bird LJ and Layland JK, Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* in Australia. *Bull Entomol Res Suppl* 1132 pp (1993).
- 15 Anon, Second conference on test methods for resistance in insects of agricultural importance. *Bull Entomol Soc Amer* 16:147–153 (1970).
- 16 Couilloud R and Giret M, Multiplication d'*Helicoverpa armigera* Hübner: améliorations possibles grâce à l'adoption d'une technique d'élevage en groupe des chenilles. *Coton Fibres Trop* 35:217–224 (1980).
- 17 Joly A and Giner M, *DL50 version 4.6*: CIRAD-CA, Montpellier, France. 30 pp (1993).
- 18 Finney DJ, *Probit analysis*, 3rd ed, Cambridge Univ Press, London. 333 pp (1971).
- 19 Chilcutt CF and Tabashnik BE, Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration–mortality line: are they related?. *J Econ Entomol* 88:11–20 (1995).
- 20 Ahmad M and McCaffery AR, Elucidation of detoxication mechanisms involved in resistance to insecticides in the third-instar larvae of a field-selected strain of *Helicoverpa armigera* with the use of synergists. *Pestic Biochem. Physiol* 51:41–52 (1991).
- 21 Djihinto A, Resistance aux pyrèthrinoides observées chez *H. armigera*, ravageur du Cotonnier au Nord-Bénin. *Mémoire de Fin d'Etudes*, ENSA, Montpellier, 36pp. (1999).

- 22 Georgiou GP and Mellon RB, Pesticide resistance in time and space, in *Pest Resistance to Pesticides*. ed by Georgiou GP and Saito T, Plenum Press, New York. pp 1–46 (1983).
- 23 Gunning RV, Easton CS, Balfe ME and Ferris IG, Pyrethroid resistance mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Sci* 33:473–490 (1991).
- 24 Daly JC, Insecticide resistance in *Heliothis armigera* in Australia. *Pestic Sci* 23:165–176 (1988).
- 25 Daly JC, Fisk JH and Forrester NW, Selective mortality in field trials between strains of *Heliothis armigera* resistant and susceptible to pyrethroids: functional dominance of resistance and age class. *J. Econ. Entomol* 81:1000–1007 (1988).

Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa

ABSTRACT *Helicoverpa armigera* is the major insect pest of cotton in Africa, Asia, and Australia. Populations recently developed resistance to pyrethroids in West Africa via the overproduction of cytochrome P450 leading to treatment failures. One way to overcome this problem and to revert the resistance is the use of antiresistant compounds, more active against the resistant individual than against susceptible one. We found an organophosphate that has this antiresistant property, the triazophos. This insecticide is currently used to manage resistance in West African *H. armigera*.

KEY WORDS *Helicoverpa armigera*, resistance, insecticides, cotton, West Africa.

INTRODUCTION In West Africa, *Helicoverpa armigera* (Hübner) is an important pest of cotton and vegetable crops. Pyrethroids were used for control in the field for the beginning of 1980s. In 1996, following the failure of treatments to control *H. armigera*, pyrethroid resistance was diagnosed (Vassal et al. 1997). Cases of resistance have already been reported in *H. armigera* in Australia (Gunning et al., 1984), Thailand (Ahmad and McCaffery, 1988), India (McCaffery et al. 1989), Turkey (Ernst and Ditttrich, 1992), Indonesia (McCaffery et al. 1991), and China (Shen et al. 1992). The two most frequently encountered mechanisms of resistance is nerve insensitivity (related to the presence of kdr gene) and metabolic detoxification involving oxidases or esterases (McCaffery, 1998). In all African

strains, resistance only originates from an increased metabolic detoxification due to oxidase overproduction (manuscript in preparation).

In response to this resistance problem, three strategies are currently used in cotton to manage the *H. armigera* resistance and to control the pest in West Africa.

1. Utilization of non-pyrethroid insecticides that did not show any cross-resistance. These insecticides are as active against the resistant individuals as susceptible ones. If resistance is linked to a decreased fitness, the proportion of resistant individuals in the population will decrease due to intraspecific competition.
2. Utilization of synergists with pyrethroids. A synergist is a molecule that interferes with the enzyme responsible for the resistance. It is used in combination with the insecticide and it increases its toxicity in the resistant strain.
3. Utilization of anti-resistant compounds. An antiresistant molecule is a pesticide that is more active against the resistant individuals compared to the susceptible one.

In the present study, we screened several insecticides in order to find some that do not show any positive cross resistance (strategy 1), as well as those that show a negative cross resistance (strategy 3).

MATERIALS and METHODS

Insects. The susceptible *H. armigera* strain used (BK77) was originally collected in Côte d'Ivoire in 1977 and reared in CIRAD Entomological Laboratory in Montpellier, France. The deltamethrin resistant strain (BK99) was collected as larvae from cotton crops in Bouaké area, in 1999. This strain was homogenized for deltamethrin resistance (BK99R9) by retaining the survivors of discriminating doses (0.6 µg/g) applied topically on third instar larvae of nine generations. Larvae were reared on artificial diet at 25°C, 75% humidity and at photoperiod of 12h/12h in the laboratory as previously described (Martin et al. 2000).

Insecticides. Deltamethrin (99%), triazophos (70.6%), phosalone (93%), and thiodicarb (Larvin375SC) were obtained from Aventis CropScience. Etofenprox (99%) was obtained from Mitsui. Profenofos (91%) was obtained from Syngenta. Chlorpyrifos (99.7%), spinosad (Laser 480 SC), and methoxyfenozide (95%) were obtained from Dow Agroscience. Cyfluthrin (97.2%), betacyfluthrin (98%), and fenthion (96%) were obtained from Bayer. Fenvalerate (95%) was obtained from Sumitomo. Cypermethrin (93.2%), bifenthrin (93.5%), and ethion (96.2%) were obtained from FMC. Indoxacarb (Avaunt 150 SC) was obtained from Du Pont de Nemours. Acephate (97%), isoxathion (93%), and monocrotophos (55.2%) were from

Calliope. Acetone was used for dilutions of technical grade materials.

Bioassays. For indoxacarb and spinosad, IRAC N°7 method was applied. Cotton leaves were dipped in the insecticide solution during 5 sec. They were drained and dried at room temperature. The turgescence of the leaves was maintained by surrounding the petiole with a cotton wool saturated with water. Each leaf was put in a petri dish with 5 larvae at the second-instar. At least five replicates were done per dose. LD50 are expressed in mg a.i. / liter.

For thiodicarb and methoxyfenozide, an ingestion method was used. 1 µl of insecticide solution were put down the surface of 2.5mm³ cubes of artificial diet. Third-instar larvae were allowed to feed on the artificial diet. 25 larvae were used per dose. LD50 was expressed in µg a.i. / g insect.

For all other insecticides, third-instar topical bioassays were used to determine insecticide toxicity (Martin et al. 2000). Five serially diluted concentrations were prepared. For each concentration, 24 third-instar larvae (35-45 mg) were treated with 1 µl of solution applied by a micro-applicator to the thorax. Each test was replicated three times and included acetone treated controls. LD50 are expressed in µg a.i. / g insect.

Mortality in all the controls was less than 10%. After dosage, the test larvae were held individually at 25°C, 75% humidity and at photoperiod of 12h/12h. Mortalities were assessed 72h after treatment. Larvae were considered dead if unable to move in a coordinated way when prodded with a needle.

Statistical analysis. In order to determine the LD50 (50% lethal dose) of an insecticide, the Finney (1971) method was used. Data from all bioassays were corrected for control mortality. The doses and mortality percentages were converted and the slopes of the response curves were estimated by probit analysis using a computer program developed by the CIRAD-CA, Montpellier, France. Log dose-probit mortality relationships were always consistent with straight lines. Resistance levels were determined by dividing the LD50 of each resistant strain by the LD50 for the susceptible strain. Differences among strains and insecticides were considered significant when the 95% confidence limits between LD50 non-overlapped.

RESULTS and DISCUSSION The response of the field BK99 strain to deltamethrin was significantly different from that of the susceptible BK77 strain. In order to analyze this resistance, we first homogenized this population by selecting for deltamethrin during 9 generations by treatment at the LD50 at each generation. This led to a resistant strain BK99R9 with a 189-fold resistance factor. To select insecticides still

efficient against the resistant population, we screened for the resistance for several insecticides (Table 1).

Resistance was positively correlated to all other pyrethroids tested. Cross-resistance also applied to the non-ester molecule, etofenprox. Although all pyrethroids that could be used have not been assayed, these results suggested the limitation of pyrethroids on cotton crops of West Africa to avoid the expansion of *H. armigera* resistance.

DDT did not show any cross-resistance to deltamethrin. This molecule has been used during more than 20 years in West Africa as the only one insecticide to control *H. armigera*. With the discovery of pyrethroids, DDT, although still efficient, was replaced in early '80s and its utilization is now forbidden. Thus the absence of cross-resistance provides only the information that pyrethroid resistance does not originate from previous treatments with DDT and most probably from other organochlorines.

Endosulfan did not show any cross-resistance. This cyclodiene is used from the '70s in mixture with DDT and methyl-parathion. It was replaced by pyrethroids in 1984. But from the development of pyrethroid resistance and the first treatment failures, endosulfan was reused with success (Ochou and Martin, 2001). From this result, it appears that this success partially originated from the absence of cross-resistance with pyrethroids.

Methoxyfenozide, indoxacarb, and spinosad are new molecules that present no cross-resistance with deltamethrin. These three molecules are efficient to control *H. armigera* in the field. But they are more specific than pyrethroids. For example, indoxacarb was not found to be efficient on *Pectinophora gossypiella* Saunders and *Cryptophlebia leucotreta* Meyrick. However, these molecules appear to be good alternatives to endosulfan since they are less toxic for humans.

Thiodicarb is a carbamate that has the particularity to have ovicidal and larvicidal action on *H. armigera*. It has never been used in West Africa yet but, as we did not find any cross-resistance, this molecule can be an alternative to endosulfan.

Organophosphates (OPs) are used to control *Polyphagotarsonemus latus* Bank, *Aphis gossypii* Glover, *Bemisia tabaci* Gennadius, and all leafworms often in mixture with pyrethroids to increase their toxicities. Some of the OPs, such as isoxathion, showed positive cross-resistance; these compounds should be avoided in future treatments. Some of the OPs, such as ethion, showed no cross-resistance; their utilization would not have any effect on the pyrethroid resistance. Interestingly, some of the OPs, such as acephate and triazophos, showed significant negative cross-resistance (Fig.1). Negative cross-resistance between pyrethroids and OPs has already been reported for Australian *H. armigera* (Forrester et al., 1993) and for

Table 1. Toxicity of insecticides to susceptible (BK7), and resistant strain (BK99R) of *H. armigera*.

Active ingredient	Strain	Slope \pm se	LD ₅₀ ^b (95% CL) ^c	RF ₅₀ ^d
Deltamethrin	S	2.16 \pm 0.29	0.055 (0.043-0.066)	-
(Pyrethroid)	R	2.44 \pm 0.37	10.4 (6.45-14.07)	189 s
Cypermethrin	S	3.56 \pm 0.66	0.257 (0.206-0.299)	-
(Pyrethroid)	R	1.69 \pm 0.3	3.657 (1.413-6.195)	14 s
Cyfluthrin	S	2.95 \pm 0.61	0.067 (0.037-0.091)	-
(Pyrethroid)	R	1.86 \pm 0.5	2.948 (0.945-4.691)	44 s
Betacyfluthrin	S	3.51 \pm 0.69	0.099 (0.064-0.127)	-
(Pyrethroid)	R	2.99 \pm 0.59	1.946 (0.965-2.803)	20 s
Fenvalerate	S	1.62 \pm 0.24	0.145 (0.108-0.176)	-
(Pyrethroid)	R	1.34 \pm 0.22	20.38 (0.729-57.5)	140 s
Efenfenthin	S	4.62 \pm 1.16	0.129 (0.09-0.14)	-
(pyrethroid)	R	2.10 \pm 0.34	1.726 (0.17-3.49)	13 s
Etofenprox	S	2.86 \pm 0.3	2.9 (1.9-3.8)	-
(pyrethroid)	R	2.02 \pm 0.4	15.8 (9.8-21.7)	5.4 s
Methoxyfenozide	S	0.9 \pm 0.1	0.62 (0.27-1.15)	-
(ecdysone agonist)	R	0.5 \pm 0.1	0.75 (0.14-2.04)	1.2 ns
Indoxacarb	S	1.7 \pm 0.3	1.1 (0.75-1.5)	-
(sodium channel blocker)	R	1.2 \pm 0.3	1.87 (1.1-3.19)	2 ns
Spinosad	S	1.8 \pm 0.3	0.88 (0.64-1.15)	-
(nicotinic receptor activator)	R	1.3 \pm 0.3	0.39 (0.17-0.59)	0.4 ns
DDT	S	2.83 \pm 0.35	59.8 (45.3-73.6)	-
(organochlorine)	R	1.14 \pm 0.41	41.2 (16.2-154)	0.68 ns
Endosulfan	S	1.9 \pm 0.7	26.4 (19.3-39.6)	-
(cyclocladien)	R	2.68	16.34 (1.19-20.57)	0.6 ns
Thiodicarb	S	1.7 \pm 0.3	3.06 (1.85-4.35)	-
(carbamate)	R	1.1 \pm 0.2	5.11 (3.05-7.91)	1.7 ns
Profenofos	S	5.1 \pm 0.9	6.84 (6.11-7.83)	-
(OP)	R	5.4 \pm 0.8	9.9 (8.50-11.30)	1.4 s
Fenthion	S	1.4 \pm 0.3	179 (59-327)	-
(OP)	R	3.5 \pm 0.5	67 (47-86)	0.4 ns
Ethion	S	2.4 \pm 0.3	1062 (824-1285)	-
(OP)	R	3.2 \pm 0.6	781 (447-1056)	0.7 ns
Phosalone	S	2.1 \pm 0.4	121 (78-185)	-
(OP)	R	1.7 \pm 0.5	77 (2.2-231)	0.5 ns
Acephate	S	10.4 \pm 7.8	121 (78-185)	-
(OP)	R	2.7 \pm 0.7	36.8 (7.5-65)	0.3 s
Monocrotophos	S	4.5 \pm 0.8	55 (47-63)	-
(OP)	R	4.3 \pm 1.1	233 (92-336)	4.2 s
Isoxathion	S	5.3 \pm 0.7	11 (9.4-12.9)	-
(OP)	R	1.9 \pm 0.8	143 (35-307)	13 s
Chlorpyrifos ethyl	S	9.1 \pm 5.1	3.42 (2.43-4.82)	-
(OP)	R	4.6 \pm 0.7	26 (21-30)	7.6 s
Triazophos	S	3.42 \pm 0.41	104.9 (39.0-144.9)	-
(OP)	R	1.96 \pm 0.24	27.8 (18.8-37.7)	0.3 s

^b LD₅₀ is expressed in μ g active ingredient per gramme of larvae; ^c 95% confidence limits shown beneath each LD₅₀; ^d RF₅₀ = Resistance Factor 50 = LD₅₀ resistant strain / LD₅₀ susceptible strain.

the brown planthoppers (Miyata et al., 1983; Kassai and Ozaki, 1984) and may originate from the dual role of oxidase in OP metabolism. Phosphorothioate OPs are not toxic. They are bioactivated inside the insect by cytochrome P450 enzymes through oxidative desulphuration (the activation of P=S to P=O) to toxic oxon analogues (Kono et al., 1983). But P450 attacks could also lead to non-toxic metabolites via for example the degradation of oxidative ester cleavage. Depending on the OP, it seems that the overproduced P450 in the resistance strain either inactivates the insecticide leading to a positive cross-resistance or activates the insecticide leading to a negative cross-resistance.

Pyrethroid resistance of *H. armigera* in BK99R9 strain seems to be limited to pyrethroids. Assays with other strains originating from different countries gave similar results. This suggests that the specificity of the resistance is applied to the whole West African cotton area. This specificity allows the selection of insecticides that efficiently control *H. armigera* and can be used as antiresistant compounds to tentatively revert the resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS The authors acknowledge the technical assistance of T. Konate, I. Ouattara and M.J. Mouso and thank Dr D. Russell (NRI), Dr R.V. Gunning (NSW Agriculture) for their corrections and comments.

REFERENCES

- Ahmad, M. and A. R. McCaffery. 1988. Resistance to insecticides in Thailand strain of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 81: 45-48.
- Ernst, G., and V. Dittich. 1992. Comparative measurements of resistance to insecticides in three closely related Old and New World bollworm species. *Pestic. Sci.* 34: 147-152.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. 3rd Edition, 333 pp. Cambridge University Press.
- Forrester, N. W., M. Cahill, L. J. Bird, and J. K. Layland. 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Bulletin of Entomological research. Supplement Series N°1*. International Institute of Entomology.
- Gunning, R. V., C. S. Easton, L. R. Greenup, and V. E. Edge. 1984. Synthetic pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77: 1283-1287.
- Kassai, T., and K. Ozaki. 1984. Effects through successive selection with fenvalerate on malathion-resistant strains of the rice brown planthopper and the small brown planthopper. *J. Pest. Sci.* 9: 73-77.
- Kono, Y., Y. Sato, and Y. Okada. 1983. Activation of an O-ethyl S-n-propyl phosphorothiolate TIA-230 in the central nerve of spodoptera larvae. *Pest. Biochem. Physiol.* 20: 225-231.
- McCaffery, A. R., A. B. S. King, A. J. Walker and H. El-Nayir. 1989. Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm *Heliothis armigera* from Andhra Pradesh, India. *Pestic. Sci.* 27: 65-76.
- Martin, T., G. O. Ochoy, N. F. Hala, J.-M. Vassal, and M. Vaissayre. 2000. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa. *Pest Management Science.* 56: 549-554.
- McCaffery, A. R., A. J. Walker and C. P. Topper. 1991. Insecticide resistance in the bollworm *Heliothis armigera* from Indonesia. *Pestic. Sci.* 31: 41-52.
- McCaffery, A. R. 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 353: 1735-1750.
- Miyata, T., T. Saito, T. Kassai, and K. Ozaki. 1983. In vitro degradation of malathion by organophosphate resistant and susceptible strains of brown planthoppers, *Nilaparvata lugens* Stal. *J. Pestic. Sci.* 8: 27-31.
- Ochoy, O. G., and T. Martin. 2001. Impact of resistance management strategies on cotton field populations of *Helicoverpa armigera*

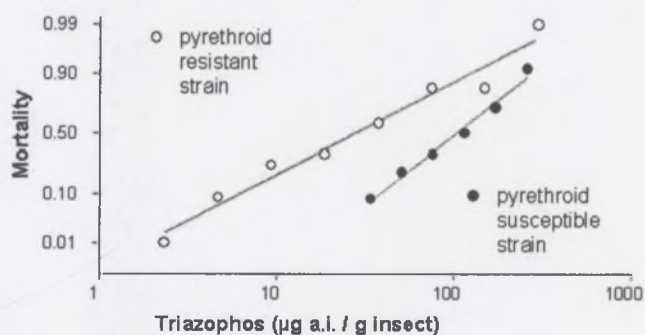


Figure 1. Toxicity of deltamethrin for *H. armigera* susceptible strain BK77 (•), and deltamethrin-selected strain BK99R9 (○).

- (Hübner) in Côte d'Ivoire, West Africa, In Proceedings of Conference Resistance 2001, Meeting the Challenge, IACR Rothamsted, UK, 24-26 September.
- Shen, J., J. Tan, B. Zhou, C. Jin, and F. Tan. 1992. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera : Noctuidae) in China. *Resistance Pest Management* 4: 22-24.
- Vassal, J.-M., M. Vaissayre, and T. Martin. 1997. Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. *Resist. Pest Manag.* 9, 2: 14-15.

Thibaud Martin & G. Ochoy Ochoy
Cotton Program of CNRA
BP 633, Bouaké
Côte d'Ivoire

Maurice Vaissayre
CIRAD Programme Coton
TA72/09 34398
Montpellier cedex 5
France

Didier Fournier
LSPCMIB
Université Paul Sabatier
31062 Toulouse
France

(Send correspondence to:
Thibaud Martin
Cotton Program
TA 72/09
34398 Montpellier Cedex
France.
E-mail: thibaud.martin@cirad.fr)

- Plapp, F. W., G. M. McWhorter, and W. H. Vance. 1987. Monitoring for pyrethroid resistance in the tobacco budworm in Texas-1986, pp. 324-326. In Proceedings 1987 Beltwide Cotton Conf., National Cotton Council, Memphis, TN.
- Plapp, F. W., Jr., J. A. Jackman, C. Campanhola, R. E. Frisbie, J. B. Graves, R. G. Luttrell, W. F. Kitten, and M. Wall. 1990. Monitoring and management of pyrethroid resistance in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Texas, Mississippi, Louisiana, Arkansas, and Oklahoma. *J. Econ. Entomol.* 83:335-341.
- Roush, R. T. and R. G. Luttrell. 1987. The phenotypic expression of pyrethroid resistance in *Heliothis* and implications for resistance management, pp. 220-224. In Proceedings 1987 Beltwide Cotton Conf., National Cotton Council, Memphis, TN.
- Sparks, T. C. 1981. Development of resistance in *Heliothis* (*Helicoverpa*) *zea* and *Heliothis virescens* in North America. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 27: 186-192.
- Walker, J. T., M. J. Sullivan, S. Turnipseed, M. E. Roof, and T. M. Brown. 1998. Prospects for field management of pyrethroid-resistant corn earworm (cotton bollworm) populations in South Carolina, pp. 1145-1147. In Proceedings 1998 Beltwide Cotton Conf., National Cotton Council, Memphis, TN.

D. R. Cook (Corresponding Author)
LSU AgCenter, Dept. of Entomology
402 Life Sciences Bldg.
Baton Rouge, LA 70803
USA

Phone (225) 578-1839
Fax (225) 578-1643
Email dcook@agctr.lsu.edu

B. R. Leonard
LSU AgCenter, Dept. of Entomology
Baton Rouge, LA 70803

R. D. Bagwell
LSU AgCenter, Scott Research and Extension Center
Winnsboro, LA 71295

S. Micinski
LSU AgCenter, Red River Research Station
Bossier City, LA 71113

J. B. Graves (Retired)
LSU AgCenter, Dept. of Entomology
Baton Rouge, LA 70803

Monitoring of Insecticide Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) from 1998 to 2002 in Côte d'Ivoire, West Africa

Helicoverpa armigera (Hübner) is the major insect pest of the cotton crop in West Africa. Populations recently developed resistance to pyrethroids via the overproduction of oxidases. To control this pest, a resistance management strategy was applied in the major West African cotton growing countries from 1999 onwards. In Côte d'Ivoire insecticide resistance of *H. armigera* was monitored in field strains from 1998 to 2002 using vial tests and topical applications in third-instar larvae. Vial tests with discriminating doses of cypermethrin were used directly on field-collected larvae at the end of the cotton season. The percentage of resistant larvae varied around 67% with 6 µg/vial and around 13% with 30 µg/vial according to year and place.

Topical applications were used in the laboratory on the first generation of populations collected from cotton (*Gossypium hirsutum*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), or a strongly infested ornamental flower (*Antirrhinum majus*) with various insecticides. The resistance factors calculated from dose-mortality regressions varied from 5 to 38 with deltamethrin. They were always higher for strains collected from cotton in the Bouaké area at the end of the season. Concerning the pyrethroid alternatives currently used in Côte d'Ivoire, no lack of susceptibility was detected with endosulfan and profenofos in the cotton field strains showing their interest in the resistance management strategy. All these results suggest a relative stability of the pyrethroid resistance in *H. armigera* for 1998 to 2002 and confirm the success of the resistance management strategy.

KEY WORDS *Helicoverpa armigera*, insecticide resistance, cotton.

INTRODUCTION More than two million small-scale farmers are cultivating cotton in West Africa on an average of 1 ha plots. Cotton is one of the most important cash crops in the region and provides more than 50% of the cash to the agricultural populations. It contributes largely to the struggle against poverty in the countries of the African Cotton Belt. Cotton crops are damaged by a large number of insect species, the most harmful being the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). To control the whole cotton pest complex, available and profitable approaches include chemicals associated with the use of hairy cultivar and appropriate cultural practices. As a result, this crop receives the largest amount of insecticide among the crops cultivated in the area. Since the early eighties, pyrethroids have been extensively used, because they are very efficient against bollworms at low doses and because their toxicity to mammals is low. However, since 1996 high infestations of *H. armigera* were observed in some areas suggesting control failure due to the development of insecticide resistance (Vassal et al., 1997; Vaissayre et al., 1998; Martin et al., 2000). In 1998, pest infestations extended to several countries in West Africa despite an increase in spaying intensity. This event became highly threatening since similar resistance observed in India and Pakistan resulted in dramatic losses of cotton production, pushing some farmers to suicide (McCaffery et al., 1988 and 1989). Facing this problem, West African countries put

together efforts to better understand the phenomenon, studying the resistance mechanism. It appears that resistance was due to greater degradation of pyrethroids in resistant insects involving oxidases from the cytochrome P450 family (Martin et al., 2002). A network group, named PR-PRAO (Prevention and Management of Pyrethroid Resistance in *H. armigera*) was implemented, involving CIRAD, IRAC, and all the actors of cotton protection in West Africa from research to extension services and advisory services to initiate management strategies and monitor programs to survey the resistance level of insecticides used.

The control of *H. armigera* on the West African cotton regions has been the focus of an insecticide resistance management strategy (IRM) restricting the use of pyrethroids in cotton (Ochou et al., 1998, Ochou and Martin, 2002). This strategy has been generally successful in all West African cotton-growing regions since 1999. As no difference in oxidases activity has been described for resistance to endosulfan, we concluded that pyrethroid resistance would not cross. As this insecticide already proved to be very efficient against the bollworm before the introduction of pyrethroids, endosulfan was chosen to replace pyrethroids in the beginning of the cotton season.

In order to assure a sustainable resistance management strategy, it was essential to survey the pyrethroid resistance levels in each cotton-growing region because of the migrating habits of *H. armigera* (Nibouche, 1994). In the present investigation we monitored the pyrethroid resistance level in *H. armigera* from 1998 to 2002 in the cotton-growing area of Côte d'Ivoire. Populations were collected in cotton (*Gossypium hirsutum*), in tomato (*Lycopersicon esculentum*), and in a strongly infested ornamental flower (*Antirrhinum majus*). The susceptibility of pyrethroid alternatives such as endosulfan and profenofos has also been surveyed.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Insects. A susceptible *H. armigera* strain (BK77) was originally collected in Côte d'Ivoire in 1977 and reared in CIRAD Entomological Laboratory from Montpellier, France. Larvae were reared on artificial diet at 25°C, 75% humidity and at 12h/12h photoperiod in the laboratory as previously described (Couilloud and Giret, 1980).

Field samples of different stages of *H. armigera* were collected from 1998 to 2002. Samples were obtained from strongly infested crops in identified farmers' fields from the cotton-growing area. The strains were named according to the nearest large town (BK: Bouaké; SAR: Sarhala; OGL: Ouangolo; NIO: Niofoin; MKN: Mankono; BOU: Boundiali) with the collection date (year/month) and the crop name: 'c' for cotton, 't' for tomato, 'g' for gumbo, and 'f' for the

ornamental flower. A minimum of 50 larvae were collected in each field and reared in the laboratory of the Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) in Bouaké on an artificial diet for one generation at 25°C. The adults were placed in cages and fed on a 5% honey solution. Their eggs were collected on sterilised gauze and washed with 1% bleach.

Insecticides. The insecticides used were all technical grade materials. Deltamethrin (99%) and endosulfan (99%) were obtained from Aventis CropScience, France. Cypermethrin (93.2%) was obtained from FMC, USA. Profenofos (95%) was provided by Syngenta, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Topical application. Standard third-instar larvae topical bioassays were used to determine insecticide toxicity. Five serially diluted concentrations were prepared. For each concentration, 10 third-instar larvae (35-45 mg) were treated with 1 µl of solution applied by microapplicator to the thorax. Each test was replicated 3 times and included acetone treated controls. Mortality in the controls was less than 10%. After dosage, the test larvae were held individually at 25°C and 75% humidity. Mortality was assessed 72h after treatment. Larvae were considered dead if unable to move in a co-coordinated way when prodded with a needle. LD50 was determined by using the Finney method (1961). Transformations and regression lines were automatically calculated by DL50 1.1 software of CIRAD.

Vial tests. Vials were impregnated with technical cypermethrin in acetone. Two discriminating doses were chosen: 5 µg/vial which killed 100% of the susceptible larvae from BK77 strain, and 30 µg/vial which killed 100% of the susceptible larvae and 60 to 80% of a resistant population collected in Benin in 1997 (Vaissayre et al., 2002). The tubes were kept in darkness at ambient temperature. Extension service agents conducted vial tests for four years in October during the strong infestation at the end of the cotton season. The three first years they worked in the areas of Bouaflé, Bouaké, Boundiali, Ferké, or Tortiya. In 2001, vial tests were conducted in twelve areas spread over the Center, West North, and North of the country. Larvae of *H. armigera* measuring 1 to 1.5 cm were collected from farmer cotton fields at least seven days after the last treatment. Two replications were conducted in different location. Each larva was placed in a vial without any food. The vials were kept horizontal and protected from heat. Larval mortality was assessed at 24 h. Larvae were considered dead if unable to move in a coordinated manner.

RESULTS

Vial tests. The vial test method was directly used in cotton field of farmers to confirm and survey the pyrethroid resistance of *H. armigera* in the whole West African cotton-growing region. Because of low infestations since the application of the IRM strategy for 1999, vial tests could be used only at the end of the cotton season. The results obtained in Côte d'Ivoire with two discriminating doses of cypermethrin are illustrated in Figure 1.

The first discriminating dose (6 µg/vial) showed high percentages of resisting larvae varying from 40 to 90%. With the second discriminating dose (30 µg/vial) the percentage of resisting larvae varied from 1 to 35%. On average, there was less than 20% of resisting larvae with 30 µg/vial of cypermethrin; this threshold corresponding with control failures in field (Vaissayre et al., 2002). Moreover this vial test method applied for the same period in Mali, Burkina Faso, Benin, and Togo, showed that *H. armigera* populations from Côte d'Ivoire have lower percentages of resisting larvae.

Despite of the low level of infestation during the survey, these results showed:

1. the presence of pyrethroid resisting larvae in all populations tested and
2. high variations between the populations tested.

Bioassays. In the same period, bioassays with topical applications were used to give results on the annual evolution of the pyrethroid resistance level in field populations. Dose-mortality regression lines were done with deltamethrin in the first generation of field populations collected from different locations from 1998 to 2001. LD50s varied from 0.30 to 1.05 µg/g indicating a low resistance level (maximum RF=20) (Fig.2).

To know the seasonal evolution of the pyrethroid resistance level in a location, dose-mortality regression lines were done in the first generation of all *H. armigera* populations collected each year from various host plants in Bouaké area. Data showed that deltamethrin LD50s in *H. armigera* varied from 0.4 to 2 µg/g (Fig. 3). Therefore, the resistance factor (RF) for field populations varied from 10 to 38 fold compared to the susceptible strain BK77. It was very difficult to find *H. armigera* in vegetables because of the sparse small plots and the high number of

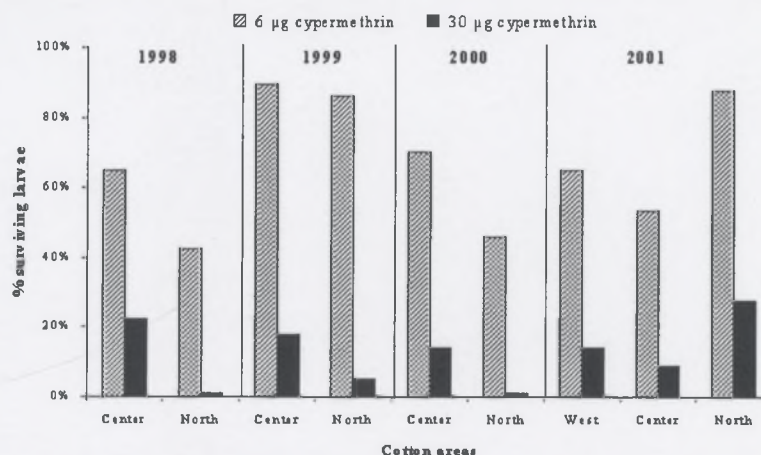


Figure 1: Vials test with 6 and 30 µg of cypermethrin in third-instar larvae of *H. armigera* populations collected in various cotton area from 1998 to 2001.

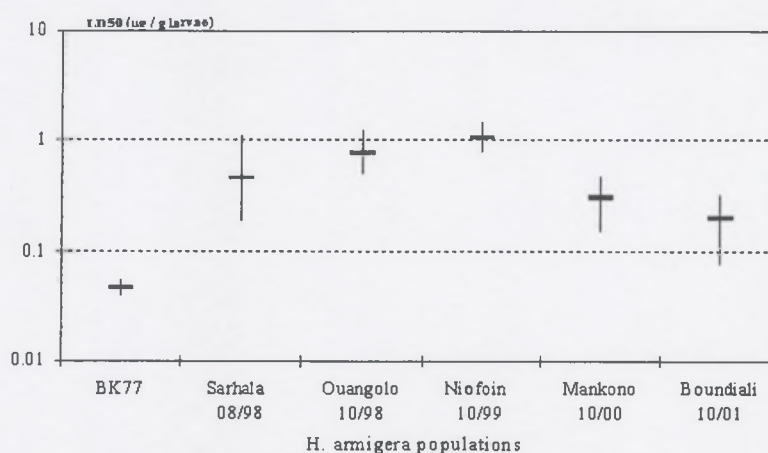


Figure 2: LD50 of deltamethrin in *H. armigera* populations collected in various cotton areas from 1998 to 2001.

treatments. The ornamental flower *A. majus*, cultivated without any treatment in small plots near the Cotton Research Station of Bouaké, appeared to be very attractive for *H. armigera* and could be very useful in the future to collect populations throughout the dry season. The highest resistance level was annually observed in populations collected from cotton in October corresponding to the last period of treatments. The resistance level slightly decreased in the dry season as shown by the resistance level of the populations collected from ornamental flowers. This result was observed as well in *H. armigera* populations collected in Benin (Djinto et al., to be published) suggesting a fitness cost of the pyrethroid resistance. *H. armigera* populations collected in October from cotton in Bouaké seemed to be always the more resistant among field populations. This result can be explained by the high number of treatments in variety multiplication plots of the Cotton Research Station of Bouaké. Interestingly, the deltamethrin toxicity of

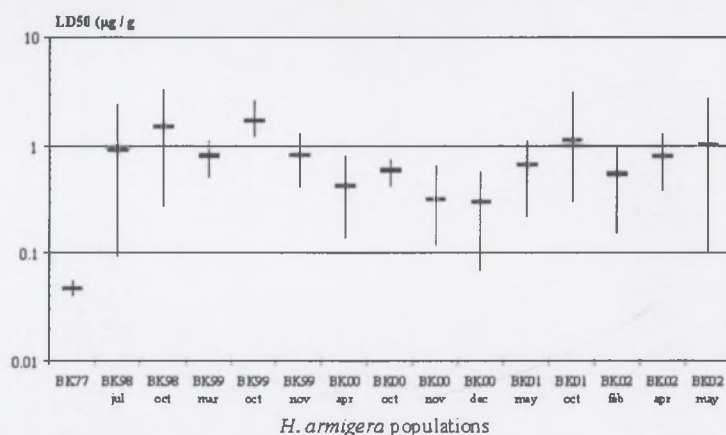


Figure 3: LD50 of deltamethrin in *H. armigera* populations collected in Bouaké area from 1998 to 2002 at various period in the year compared to LD50 of the susceptible strain (BK77).

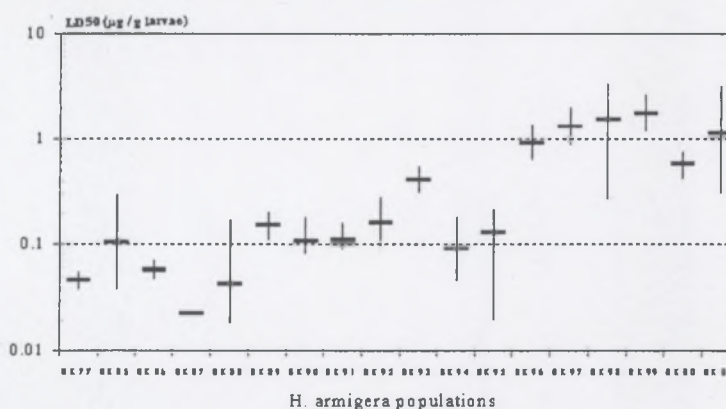


Figure 4: LD50 of deltamethrin (with 95% confidence intervals) in susceptible strain BK77 and annual Bouaké cotton field populations of *H. armigera* collected in October from 1985 (BK85) to 2001 (BK01).

these populations has been surveyed in each year since 1985 (Fig. 4). Three plateaux appeared showing schematically the apparition of pyrethroid resistance in *H. armigera* populations from Bouaké: susceptibility (1985-1988), decrease of susceptibility (1989-1995) and resistance (1996-2001).

Concerning the survey of pyrethroid alternatives, dose-mortality regression lines for endosulfan and profenofos have been done annually since 1999 in Bouaké populations. Endosulfan LD50s of field populations were at the same level than BK77 (Fig. 5). Thus endosulfan did not show any resistance in *H. armigera* cotton field populations. This cyclodiene is used from the 1970's in mixtures with DDT and methyl-parathion. It was replaced by pyrethroids in 1984. But from the development of pyrethroid resistance, endosulfan was reused alone with success (Ochou and Martin, 2002). From this result, it appears that this success partially originates from the absence

of cross-resistance with pyrethroids (Martin et al., 2002). It is the same for the profenofos that did not show any resistance in *H. armigera* field populations (Fig. 6). This organophosphorus compound was used since 1977 in mixtures with pyrethroids to control the mites. It was used alone for 2000 as pyrethroids alternative. No cross-resistance was detected with pyrethroids (Martin et al., 2002).

DISCUSSION Results obtained on larvae with the application of discriminating doses by vial test method confirmed the presence of resistant *H. armigera* in all the field populations collected in Côte d'Ivoire. The larva vial test was not an accurate method. However, results obtained directly in the field were indicators of the pyrethroid resistance and could be confirmed with the bioassay method. Bioassays results showed that the deltamethrin resistance level in *H. armigera* populations could be considered as low in Côte d'Ivoire (in average RF<20) whatever the host plant, the collecting date, and the location of the population. The deltamethrin resistance level was generally highest in populations collected at the end of cotton treatments and decreased during the dry season. Therefore the pyrethroid resistance appeared globally stable from 1998 to 2002. This result may be an indicator of the success of the resistance

management program.

That no resistance was detected for endosulfan and profenofos in field populations indicated the success of these pyrethroid alternatives. Therefore, endosulfan and profenofos resistance was showed in *H. armigera* from Pakistan (Ahmad et al., 1995) and Australia (Forrester et al., 1993; Gunning et al., 1995) indicating the risk of introduction of these genotypes in West Africa and their further selection. Moreover, cotton insecticides were frequently used in vegetable crops during the dry season to control *H. armigera*. So monitoring of insecticides resistance must be occurring and new molecules such as indoxacarb and spinosad, efficient to control *H. armigera* (Ochou and Martin, 2002), have to be used in mosaic with endosulfan and profenofos to limit the risk of selection of new cases of resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS The authors thank the research and development unit team of cotton companies (CIDT, IC, and LCCI) and the technical assistance of T. Konate, I. Ouattara, and M.J. Mouso of the entomological laboratory of the CNRA (Centre National de Recherche Agronomique).

REFERENCES

- Couilloud, R. and Giret, M. (1980). Multiplication d'*Helicoverpa armigera* Hübner: améliorations possibles grâce à l'adoption d'une technique d'élevage en groupe de chenilles. *Coton et Fibres Tropicales*, 35: 217-224.
- Finney, D. J. (1971). Probit analysis. 3rd Edition, Cambridge University Press pp.333.
- Forrester, N.W., Cahill, M., Bird, L. J. and Layland, J. K. 1993 Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. In *Bull. Entomol. Res. Supplement Series N°1*. International Institute of Entomology pp. 1-132.
- Gunning, R. V. and Easton, C. S. (1993) Resistance to organophosphate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Gen. Appl. Entomol.*, 25: 27-34.
- McCaffery, A. R., Maruf, G. M., Walker, A. J. and Styles, K. (1988). Resistance to pyrethroids in *Heliothis* spp.: Bioassay methods and incidence in populations from India and Asia. Brighton Crop Protection Conference - pests and diseases -, 433-438.
- McCaffery, A. R., King, A. B. S., Walker, A. J. and El-Nayir, H. (1989). Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm *Heliothis armigera* from Andhra Pradesh, India. *Pesticide Science*, 27: 65-76.
- McCaffery, A. R. (1998). Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* pp. 1735-1750.
- Martin, T., Ochou, O. G., Hala N'Klo, F., Vassal and J. M., Vaissayre, M. (2000). Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), in West Africa. *Pest Management Science*, 56: 549-554.
- Martin, T., Chandre, F., Ochou, O. G., Vaissayre, M. and Fournier, D. (2002). Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pesticide Biochemical Physiology*, 74 : 17-26.
- Martin, T., Ochou, O. G., Vaissayre, M. and Fournier D. (2002). Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 1.
- Nibouche, S. (1994). Cycle évolutif de *Helicoverpa armigera* (Hübner) dans l'ouest du Burkina Faso. Thèse de Doctorat, 15/12/1994. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, France. pp.143.
- Ochou, O. G., Martin, T. and Hala N'Klo, F. (1998). Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa. *Proceedings of the World Cotton Research Conference-2*. Athens, Greece, September 6-12, pp. 833-838.
- Ochou, G. O. and Martin, T. (2002). Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner): Recent Developments and Prospects for its Management in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 1.
- Vaissayre, M., Vassal, J. M. and Martin, T. (1998). Pyrethroid resistance in the bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in West Africa. *Proceedings of the World Cotton Research Conference-2*. Athens, Greece, September 6-12, pp. 701-705.
- Vaissayre, M., Vassal, J. M., Staetz, C. and Irving, S. (2002). A Vial Test Method for the Survey of Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* in West Africa. *Resistance Pest Management Newsletter*, 12, 1.
- Vassal, J. M., Vaissayre, M. and Martin, T. (1997). Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. *Resistance Pest Management* 9, 2, 14-15.

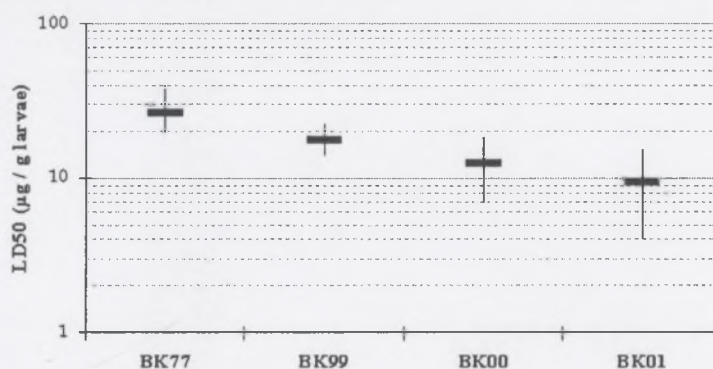


Figure 5: LD50 of endosulfan in susceptible strain BK77 and in three field populations collected from cotton in Bouaké in 1999 (BK99), 2000 (BK00) and 2001 (BK01).

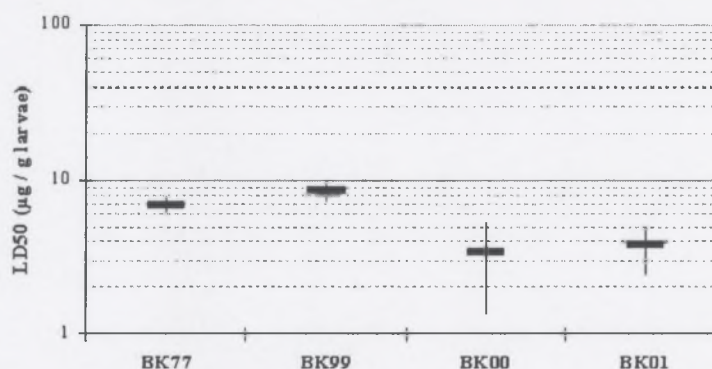


Figure 6: LD50 of profenofos in susceptible strain BK77 and in three field populations collected from cotton in Bouaké in 1999 (BK99), 2000 (BK00) and 2001 (BK01).

T. Martin

CNRA, Programme coton
BP 633, Bouaké
Côte d'Ivoire
&
CIRAD-CA, Programme coton, TA72/09
34398, Montpellier cedex 5
France

G. O. Ochou

CNRA, Programme coton
BP 633, Bouaké
Côte d'Ivoire

M. Vaissayre

CIRAD-CA, Programme coton, TA72/09
34398, Montpellier cedex 5
France

D.Fournier

IPBS-UMR 5089
205 Route de Narbonne
F-31077 Toulouse
France



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Pesticide Biochemistry and Physiology 74 (2002) 17–26

PESTICIDE
Biochemistry & Physiology

www.academicpress.com

Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa

T. Martin,^{a,b,*} F. Chandre,^c O.G. Ochou,^b M. Vaissayre,^a
and D. Fournier^d

^a Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement, 34000 Montpellier, France

^b Centre National de Recherche Agronomique, BP 633 Bouaké, Ivory Coast

^c Institut de Recherche pour le Développement, Bouaké, Ivory Coast

^d Groupe de Biochimie des Protéines, LSPCMIB, UMR 5062, Université Paul Sabatier 31062, Toulouse, France

Received 10 May 2002; accepted 18 September 2002

Abstract

In West Africa, the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* has recently developed resistance to deltamethrin and cypermethrin. Resistance mechanisms of the strain BK99R9 collected in Bouaké, Ivory Coast in 1999 and selected with deltamethrin were investigated by comparison with a susceptible strain BK77 collected in the same area in 1977. Several approaches were performed: evaluation of the cross-resistance spectrum to various pyrethroids and DDT, effect of a synergist, and by determination of the biochemical characteristics of three enzyme systems (esterases, glutathione-S-transferases, and mixed function oxidases). Deltamethrin resistance in BK99R9 was correlated to an increase of mixed function oxidase. Enhanced monooxygenase levels were then confirmed in several *H. armigera* field strains collected in cotton areas of West Africa from 1999 to 2001.

© 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Resistance mechanism; *Helicoverpa armigera*; Oxidase; Pyrethroids; Cotton; West Africa

1. Introduction

Helicoverpa armigera (Hübner) is an economically important pest of cotton and vegetable crops. Control is usually achieved with insecticides especially pyrethroids. In Asia and Australia, *H. armigera* has developed resistance to

virtually all the insecticides that have been applied against it in any quantity [1]. In West Africa, deltamethrin and cypermethrin susceptibility in *H. armigera* was surveyed annually from 1984. Pyrethroid resistance was detected in 1996 [2,3]. At the same time, pyrethroid resistance was also detected in South Africa [4]. A resistance management strategy based on the restriction of pyrethroid use was rapidly implemented in all cotton farmers of West African countries [5].

In most countries, pyrethroid resistance mechanisms of *Helicoverpa armigera* are multiple.

* Corresponding author. Fax: +225-31-63-45-91.

E-mail address: thibaud.martin@cirad.fr (T. Martin).

Evidence for the involvement of a nerve insensitivity mechanism (*kdr*), the target site resistance mechanism to pyrethroids, has been shown in *H. armigera* from Australia, India, China, and Thailand [6–10]. In every case, the presence of cross-resistance between DDT and pyrethroids was observed. In *H. armigera* the *kdr* mechanism was generally associated with other mechanisms, such as enzymatic detoxification of pyrethroids. The main systems revealed by biochemical studies are oxidation by microsomal P450 monooxygenases and hydrolysis by esterases [1]. In central India, enzyme assay data indicated that high cytochrome P450 levels generally coincided with low esterase activity and vice versa [11]. Glutathione-S-transferases are also involved in resistance to pyrethroids in Indian strains. In Australia an important study suggested that the pyrethroid resistant *H. armigera* have enhanced esterase activity and that the esterases were acting as insecticide-sequestering agents [12]. An other mechanism which reduced penetration (*Pen*) appeared to be important for esfenvalerate resistance in an Australian resistant strain of *H. armigera* [13]. In comparison, the African species could be an exception as resistance seems to be limited to pyrethroids (submitted for publication). It has been shown that deltamethrin resistance in West African *H. armigera* was largely suppressible by the piperonyl butoxide (PBO)¹ [14].

Most of the classical methods to evaluate oxidase activity with chromogenic substrates in insects require the purification of microsomal fractions [15–19]. But these methods cannot be used to measure differences in oxidases from a single insect. Another alternative is to measure the level of heme-containing enzymes, which includes the cytochrome oxidase enzymes [20]. The amount of oxidases is correlated with the peroxidase activity of the heme groups. Such a technique would provide a useful means for measuring large-scale differences in oxidase levels characteristic of resistance and oxidase induction.

In the present investigation, the physiological mechanisms responsible for the deltamethrin resistance of *H. armigera* from West Africa were identified by analysing: (1) the synergistic effect of

PBO, (2) the resistance spectrum to various pyrethroids and DDT, and (3) the activity of various enzymes known to be involved in pyrethroid resistance. Then the resistance mechanism was confirmed in field strains since resistance mechanisms in *H. armigera* can change markedly over a single cropping season or between assays on laboratory-reared insects as shown in India [11].

2. Materials and methods

2.1. Insects

A susceptible *H. armigera* strain (BK77) was originally collected in the Ivory Coast in 1977 and reared in CIRAD Entomological Laboratory in Montpellier, France [21]. To establish the deltamethrin resistant strain (BK99R9), about a hundred larvae were collected in October 1999 in the Cotton Research Station of Bouaké, Ivory Coast, where field control failures have been observed since 1995. This strain was then homogenised by nine selections for deltamethrin resistance as previously described for the Australian *H. armigera* [22]. Selection was done for five generations by retaining the survivors at a discriminating dose (0.6 µg/g, the LD₉₉ of the susceptible strain) topically applied on third-instar larvae. Fifty to ninety percent of survival was obtained with the selecting dose. Larvae were reared on artificial diet at 25 °C, 75% humidity, and at 12h/12h photoperiod in the laboratory as previously described [14].

Field samples of different stages of *H. armigera* were collected from 1998 to 2001. Samples were obtained from strongly infested crops in identified farmers' fields from the West African cotton-growing areas. The strains were named according to the nearest large town (KDG: Konodougou, Mali; BK: Bouaké, Ivory Coast; KHO: Korogho, Ivory Coast; MK: Mankono, Ivory Coast; FKB: Farakoba, Burkina Faso; BOU: Boundiali, Ivory Coast) with the collect date (year/month) and the crop name: *c* for cotton (*Gossypium hirsutum*), *t* for tomato (*Lycopersicum esculentum*), and *g* for gumbo (*Hibiscus esculentus*). For example, the strain collected in Bouaké area in 1999, October, from cotton was named BK99/10c. A minimum of 50 larvae were collected in each field and reared in the laboratory on an artificial diet for one generation at 25 °C. The adults were placed in cages and fed on a 5% honey solution. Their eggs were collected on sterilised gauze and washed with 1%

¹ Abbreviation used: PBO, piperonyl butoxide; αNA, α-naphthyl acetate; PNPA, *p*-nitrophenyl acetate; GST, glutathione-S-transferase; GSH, reduced glutathione; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; TMBZ, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine; BCA, bicinchoninic acid.

bleach. For each strain, 25 second-instar larvae were frozen at -75°C for biochemical assays and 60 third-instar larvae were used for topical application with the discriminating dose of deltamethrin ($0.6\text{ }\mu\text{g/g}$). Insects were weighed before treatment and the dose was adjusted for larval weight.

2.2. Chemicals

The insecticides used were all technical grade materials. Deltamethrin (99%) and the synergist PBO (99%) were obtained from Aventis Crop-Science, France. Bifenthrin (93.5%) and cypermethrin (93.2%) were obtained from FMC, USA. Fenvalerate (95%) was provided by Sumitomo and etofenprox (99%) by Mitsui, Japan. Acetone was used for dilutions. BCA Protein Assay was from Pierce, The Netherlands. Cytochrome C, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMBZ), α -naphthyl acetate (α NA), Fast Garnet salt, *para*-nitrophenyl acetate (PNPA), glutathione (GSH), and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) were from Sigma, France. Solutions of CDBN (64.3 mM) and TMBZ (8.3 mM) were prepared in methanol just before using.

2.3. Bioassays

Standard third-instar larvae topical bioassays were used to determine insecticide toxicity [14,22]. Five serially diluted concentrations were prepared. For each concentration, 10 third-instar larvae ($35\text{--}45\text{ mg}$) were treated with $1\text{ }\mu\text{l}$ solution applied by microapplicator to the thorax. Each test was replicated three times and included acetone treated controls. Mortality in the controls was less than 10%. PBO was applied at $10\text{ }\mu\text{g/larva}$ 1 h before application of deltamethrin. This dose did not result in any toxicity. After dosage, the test larvae were held individually at 25°C and 75% humidity. Mortality was assessed 72 h after treatment. Larvae were considered dead if unable to move in a coordinated way when prodded with a needle. With the same method, a discriminating dose of deltamethrin ($0.6\text{ }\mu\text{g/g}$), corresponding to LD_{50} of the susceptible strain (BK77), was applied in 60 third-instar larvae of *H. armigera* field strains collected from 1998 to 2001.

2.4. Enzyme preparation

For enzyme preparations, 40 second-instar larvae ($5\text{--}10\text{ mg}$) from the susceptible and the re-

sistant strains and 25 for each field strain were used [23]. Individual insects were homogenised in $200\text{ }\mu\text{l}$ distilled water at 4°C . The homogenate was spun at $14,000g$ for 2 min at 4°C in a microfuge.

2.5. Oxidase assay

The assay mixture consisted of $80\text{ }\mu\text{l}$ of 62.5 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, added to a $20\text{-}\mu\text{l}$ aliquot of enzyme source. Two hundred μl solution was added, containing 13 mg TMBZ dissolved in 6.5 ml methanol with 19.5 ml of 0.25 M sodium acetate buffer ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), pH 5.0. Then $25\text{ }\mu\text{l}$ hydrogen peroxide (3%) was added. Absorbance at 630 nm was read against blanks after 30 min incubation at 25°C . Total oxidase activity was expressed as nmol equivalent cyt-P450/mg protein. The standard curve of cytochrome C is accurately described by a linear equation.

2.6. Esterase assay

Hydrolysis of α NA was performed by incubating $10\text{ }\mu\text{l}$ sample with $90\text{ }\mu\text{l}$ of 1% Triton X-100, 10 mM phosphate buffer, pH 6.5, 136 mM NaCl, and 2.6 mM KCl, for 10 min at 25°C . One hundred μl solution containing 0.5 ml of 15 mM α NA plus 2.5 ml of 1% Triton X-100 of 10 mM phosphate buffer, pH 6.5, 136 mM NaCl plus 7 ml H_2O was added and the mixture was incubated for 30 min at 25°C . The reaction was stopped by addition of $100\text{ }\mu\text{l}$ distilled water containing 0.08 mg Fast Garnet salt. Absorbance at 550 nm was read against blanks. Hydrolysis of PNPA was performed using a $10\text{-}\mu\text{l}$ sample with two replicates and incubated with $200\text{ }\mu\text{l}$ of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4, 10 mM PNPA. The microplate was maintained for 5 min at 25°C . Absorbance at 420 nm was read against blanks.

2.7. Glutathione-S-transferase assay

Ten μl samples were mixed with $200\text{ }\mu\text{l}$ of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.5, containing 10 mM GSH and 6 mM CDBN. Kinetic assays were immediately performed on a microplate reader taking absorbance readings (340 nm) automatically for 5 min.

2.8. Protein assay

The Pierce BCA Protein Assay, a detergent-compatible formulation based on bicinchoninic

acid (BCA), was used for the colorimetric detection and quantification of total protein. Ten- μ l aliquot was incubated for 30 min at 25 °C with 200 μ l solution containing 20 ml BCA reagent A and 400 μ l BCA reagent B. Absorbance at 590 nm was read against blanks.

2.9. Analysis

LD₅₀ (lethal dose 50%) was determined by using the Finney method [24]. Transformations and regression lines were automatically calculated by DL50 1.1 software of CIRAD. Readings and the transformations were made automatically by microplate reader using KC4 Kinetic Windows software from Bio-Tek Instruments. As resistant strains were not homogeneous, a Mann–Whitney test was used to check the equality of the means of two populations based on Minitab software.

3. Results

3.1. Bioassays

Bioassay results of deltamethrin with or without PBO on *H. armigera* susceptible strain (BK77) and deltamethrin-selected strain (BK99R9) are shown in Table 1. The strain BK99R9 was 189-fold more resistant to deltamethrin than BK77. PBO pre-treatment had no effect on deltamethrin toxicity in the susceptible strain, but it almost fully suppressed resistance in the deltamethrin

resistant individuals, confirming results obtained in 1997 in field strains collected in Côte d'Ivoire [14] and in Benin (Djihinto, personal communication). The deltamethrin resistance factor decreased from 189-fold without PBO to 4-fold with PBO. The BK99R9 strain was 5-, 15-, and 163-fold more resistant to the three other pyrethroids etofenprox, bifenthrin, and fenvalerate, respectively, than to the susceptible strain BK77. Alterations in the pyrethroid structure, notably etofenprox which is not an ester compound, did not completely overcome the resistance (Fig. 1).

Mortality obtained with DDT for the deltamethrin-selected strain BK99R9 did not differ from mortality observed with the susceptible strain except that the slope of the mortality–dose curve was weak, suggesting that the pyrethroid resistant strain was more heterogeneous (Fig. 2). Mortality was similar to a cotton field strain recently collected, BK01.

3.2. Biochemical analysis

The technique of heme peroxidation to analyse variation in oxidase levels allowed rapid determination of resistance frequency. The simplicity of the method made it feasible in laboratories surveying pyrethroid resistance of *H. armigera*. The level of oxidase enzymes in single insects is correlated with hemoprotein level and with the peroxidase activity of the heme group [20]; however, this method does not provide information on specific oxidases. We used the method to estimate

Table 1

LD₅₀, resistance factor (RF), and synergistic factor (SF) for deltamethrin with and without PBO, three other pyrethroids (fenvalerate, bifenthrin, and etofenprox) on susceptible and resistant strains of *H. armigera*

Active ingredient	Strain ^a	LD ₅₀ (μ g/g)	95% confidence intervals	Slope \pm SEM	RF ^b	SF ^c	χ^2
Deltamethrin	S	0.055	0.043–0.066	2.16 \pm 0.29	—	—	4.9
	R	10.40	6.45–14.07	2.44 \pm 0.37	189	—	10.7
Deltamethrin + PBO	S	0.044	0.017–0.064	3.35 \pm 0.74	—	1.3	1.3
	R	0.192	0.074–0.341	1.56 \pm 0.25	4	54	10.3
Fenvalerate	S	0.145	0.108–0.176	1.62 \pm 0.24	—	—	6.2
	R	23.64	13.47–35.74	1.50 \pm 0.22	163	—	5.7
Bifenthrin	S	0.129	0.09–0.14	4.62 \pm 1.16	—	—	1.7
	R	1.931	1.299–2.574	2.32 \pm 0.34	15	—	3.7
Etofenprox	S	2.937	1.898–3.850	2.91 \pm 0.37	—	—	5.8
	R	15.79	9.83–21.72	2.20 \pm 0.41	5	—	9.8

^a S for the susceptible strain BK77 and R for the pyrethroid resistant strain BK99R9.

^b Resistance factor (RF), calculated as the ratio of LD₅₀ resistant/LD₅₀ susceptible.

^c Synergistic factor (SF), calculated as the ratio of LD₅₀ deltamethrin/LD₅₀ (deltamethrin + PBO).

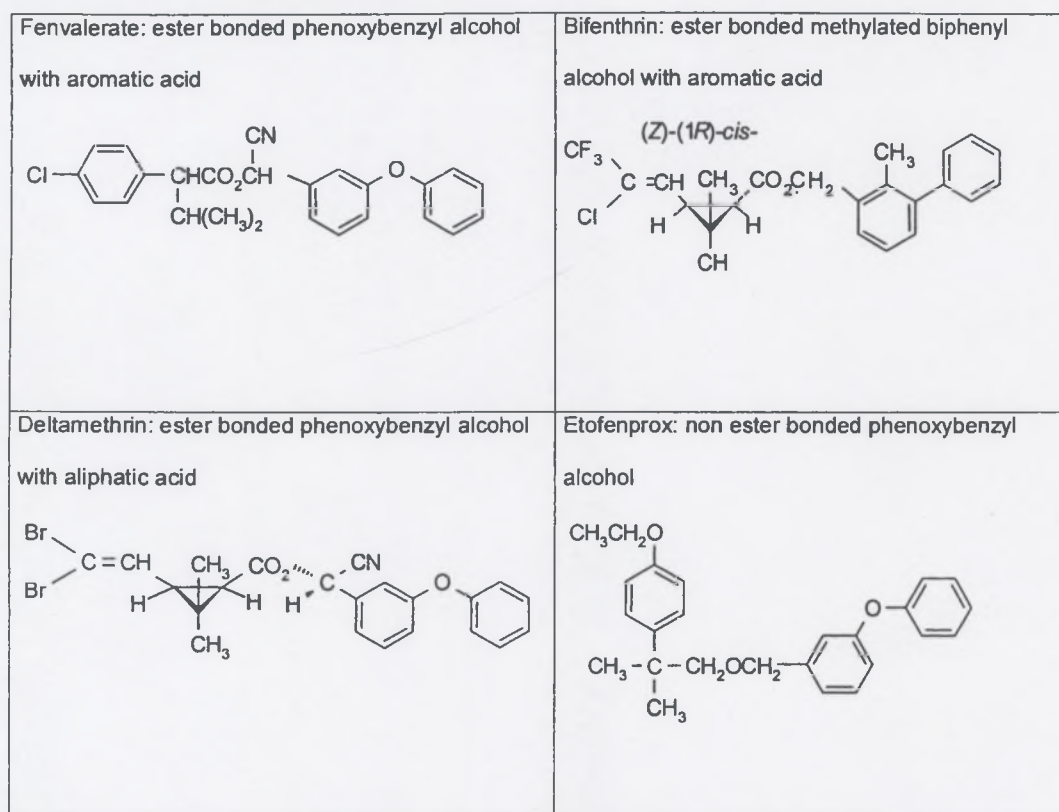


Fig. 1. Structures of pyrethroids tested in this study. Fenvalerate, deltamethrin, bifenthrin, and etofenprox represent the major type of structure.

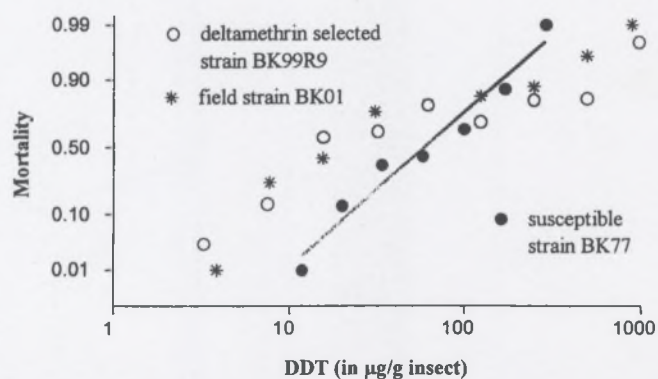


Fig. 2. Toxicity of DDT for the *H. armigera* field strain (*), the deltamethrin selected strain (○), and the susceptible strain (●). Mortality obtained with DDT in the pyrethroid resistant strains was not linear, indicating heterogeneity of tolerance in these strains.

the hemoprotein level in each larva. A significant elevation of oxidases was observed in the resistant strain BK99R9 (Table 2). The deltamethrin-selected strain had 3.8-fold higher quantities of

cyt-P450 than the susceptible one. An increased quantity of oxidase was observed to parallel the deltamethrin resistance factor of the successive generations selected with deltamethrin. This

Table 2

Mean esterase and glutathione-*S*-transferase activities and median oxidase amount for *H. armigera* pyrethroid resistant strain (BK99R9) and susceptible strain (BK77)

Strain	N ^a	Esterase ^b (α NA) in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein	Esterase ^c (PNPA) in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein	Oxidase in nmol equiv. cyt-P450 U/mg protein	GST ^d in $\mu\text{mol}/\text{min}/$ mg protein
Susceptible	40	0.161	0.183	3.224	0.202
Resistant	40	0.074*	0.131*	12.352*	0.554*

^a N indicates the number of larvae tested.

^b Esterase activities obtained with α -naphthyl acetate like substrate.

^c Esterase activities obtained with *para*-nitrophenyl acetate like substrate.

^d GST: glutathione-*S*-transferase activities.

* Indicates a significant difference with the susceptible strain with $P < 0.05$ by Mann–Whitney test.

suggests that detoxification by oxidative enzymes may be a major resistance mechanism.

The level of cyt-P450 in individual insects from the susceptible and the pyrethroid resistant populations is illustrated in the frequency distribution of oxidase activity (Fig. 3). It revealed homogeneous, low levels in the susceptible population BK77 and a higher, more heterogeneous oxidase level in the resistant population BK99R9. In BK77, the quantity of cyt-P450 equivalent was always below 10 nmol/mg protein. The deltamethrin-selected strain contained only a small portion (25%) of individuals with less than 10 nmol cyt-P450 U/mg protein.

The glutathione-*S*-transferase (GST) activity of the deltamethrin-selected strain BK99R9 was significantly (2.7-fold) higher than in the susceptible strain (Table 2). The esterase activities were

measured with two substrates, α NA or PNPA, because some esterases may be specific. Mean values in the resistant strain of *H. armigera* were significantly lower than those of the susceptible strain.

Helicoverpa armigera field strains collected on various host plants from 1998 to 2001 were tested with a discriminating dose of deltamethrin (0.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ larva). The portion of resistant individuals varied from 15 to 77% compared with 89% in the deltamethrin-selected strain BK99R9 (Table 3). Biochemical assays have also been used in the same strains (Fig. 4). For five of them, the oxidase levels were significantly higher than for the susceptible strain. The mean of their oxidase contents varied between 2.3 and 8.9 nmol P450 U/mg protein compared with 2.1 nmol P450 U/mg protein for the susceptible strain. We found a positive

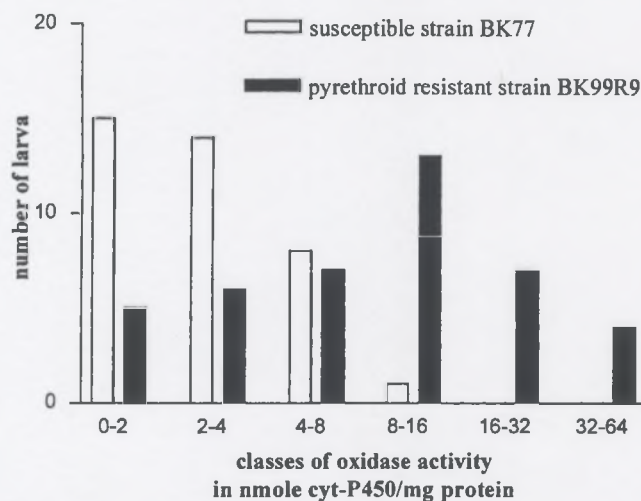


Fig. 3. Frequency distribution of oxidase level (nmol/mg) in individuals from the susceptible (BK77) and the pyrethroid resistant (BK99R9) *H. armigera* strains. For each strain, $n = 40$.

Table 3

Strains ^a	% surviving larva ^b ± SEM	Esterase ^c (αNA)	Esterase ^c (PNPA)	Oxidase ^d	GST ^e
BK77	1% ± 0.01	0.161	0.183	3.224	0.202
KDG98/10c	69% ± 0.06	0.140	0.162	5.124*	0.278*
BK99/03t	58% ± 0.06	0.123	0.155	6.536*	0.184
BK99/04g	—	0.103	0.174	4.861*	0.170
KHO99/06g	52% ± 0.07	0.111	0.017	8.950*	0.173
BF99/9c	—	0.055	0.091	2.356*	0.142
MB99/9c	—	0.058	0.113	1.656	0.133
BK99/10c	77% ± 0.05	0.064	0.117	3.770	0.105
KHO99/10c	55% ± 0.06	0.135	0.029	3.796	0.131
NIO99/10c	—	0.111	0.015	1.191	0.104
BK00/04t	—	0.146	0.159	3.975	0.094
BK00/10c	49% ± 0.07	0.070	0.055	2.775	0.103
MK00/10c	31% ± 0.06	0.108	0.096	5.875*	0.200
FKB01/08c	19% ± 0.05	0.017	0.065	2.150	0.107
BOU01/10c	15% ± 0.05	0.053	0.126	2.150	0.221
BK01/10c	54% ± 0.06	0.033	0.136	3.075	0.128

^a Strains collected (year/month) from cotton (c), tomato (t) or gumbo (g): BK77: susceptible strain; KDG: Kono-dougou, Mali; BK: Bouaké, CI; KHO: Korogho, CI; BF: Bouafé, CI; MB: M'Bengué, CI; NIO: Niofoin, CI; MK: Mankono, CI; FKB: Farakoba, Burkina Faso; BOU: Boundiali, CI; BK99R9: deltamethrin selected strain.

^b Discriminating dose of deltamethrin (0.6 µg/g larva).

^c Esterase and glutathione-*S*-transferase activities are expressed in µmol/min/mg protein.

^d Oxidase level is expressed in nmol equivalent cyt-P450 U/mg protein.

^e Indicates a significant difference with the susceptible strain BK77 with $P < 0.05$ by Mann–Whitney test.

correlation ($r^2 = 0.40$; slope is significantly non-zero) between the level of oxidase and resistance in the field strains (Table 3, Fig. 4). But we did not find any correlation between esterase and glutathione-*S*-transferase activities and deltamethrin resistance.

4. Discussion

The present investigation suggests that the resistance to pyrethroids in natural populations of *H. armigera* from West Africa is associated with an increase in oxidase metabolism as shown by the fact that resistance was abolished by PBO pre-treatment and that cyt-P450 levels were higher in resistant insects. Analysis of the deltamethrin-selected strain BK99R9 collected in Ivory Coast in 1999 showed this strain to have a higher level of cyt-P450, an increased GST activity, and a decreased esterase activity compared with the susceptible strain. Analysis of the resistant field populations collected from 1998 to 2001 allowed discrimination between these three mechanisms; since only the increase of cyt-P450 was correlated to resistance. The importance of oxidative attack: in resistance to pyrethroids has been already shown in *H. armigera* from India

[11] and China [25] and in *Heliothis virescens* from the US cotton belt [26–28]. DDT did not show any cross-resistance to deltamethrin since toxicological studies did not discriminate between the susceptible and the resistant strains. This molecule has been used for more than 20 years in West Africa as the only one insecticide to control *H. armigera*. With the discovery of pyrethroids, DDT although still efficient was replaced in early 1980s and its utilization is now forbidden. Thus the absence of cross-resistance provides the information that pyrethroid resistance does not originate from previous treatments with DDT and most probably from other organochlorines. Therefore, the *kdr* mechanism was not involved.

The major involvement of cyt-P450 is indirectly confirmed by cross-resistance with all pyrethroids tested, as shown by the fact that all these chemicals have typical oxidation sites on the alcohol moiety or on the acid moiety [29]. The involvement of oxidases may explain the negative cross-resistance observed with triazophos in pyrethroid resistant strains compared with susceptible strains (manuscript submitted). Triazophos is an organophosphate activated by P450 to give an active oxon form. An increase of cyt-P450 responsible for this activation would increase the

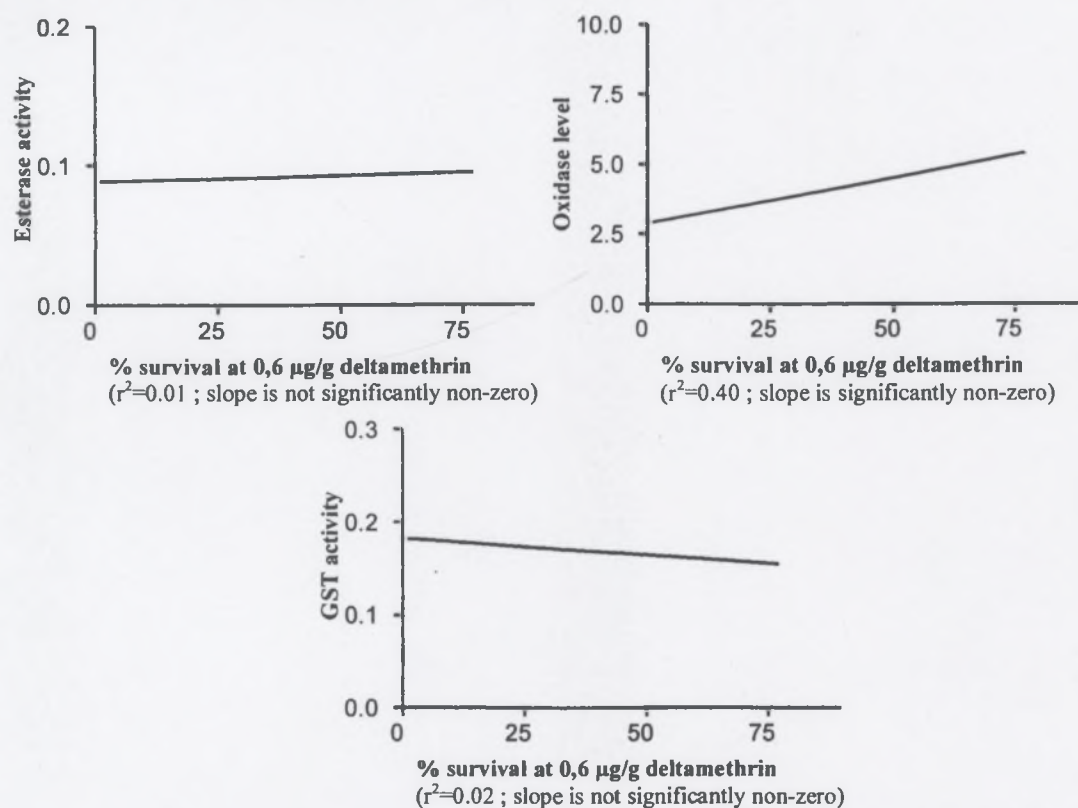


Fig. 4. Relation between the percentage of larvae of *H. armigera* surviving a discriminating dose of deltamethrin (0.6 µg/g) and enzymatic activities of esterase and glutathion-*S*-transferase and level of oxidase in *H. armigera* field populations compared with the susceptible strain (BK77) and the pyrethroid resistant strain (BK99R9).

concentration of the active form in pyrethroid resistant insects.

Other pyrethroid resistance mechanisms may exist. Several lines of evidence suggested that esterases can also be involved: (1) There was a lower esterase activity in the resistant strains showing that esterases are not identical in the susceptible and the resistant strains. That esterase would be different in the hydrolysis of classical chromogenous substrates [11,12,28]. (2) PBO is a moderately effective esterase inhibitor [30], suggesting that inhibition of esterases may contribute to the observed synergism. (3) We observed a low cross-resistance with etofenprox, a non-ester pyrethroid. The 5-fold resistance factor is very marginal compared to those obtained for the fenvalerate and deltamethrin and may be due to strain differences and not resistance. This would suggest that esterase may be involved in the resistance mechanism. Furthermore, we cannot eliminate the involvement of GST since their activity was significantly higher in BK99R9 strain. However,

we did not find any correlation between esterase and GST activities and deltamethrin resistance, suggesting that if these enzymatic mechanisms exist, they are not widespread in field populations. In conclusion there was no doubt in the involvement of MFO in the resistance mechanism which does not exclude the involvement of esterases or glutathione-*S*-transferases. Further biochemical studies of the purified enzyme activities will bring information toward a better understanding of resistance mechanisms to pyrethroids in *H. armigera*.

Conservation of pyrethroid efficacy in bollworms for an extended period is a challenge for all West African countries. Knowing oxidase involved in the pyrethroid resistance of *H. armigera* allows the use of resistance-breaking molecules within existing conventional insecticide groups like the organophosphorus compounds. Thiophosphates are activated by mixed function oxidases in such a way that in their oxidised form a neurotoxic action occurs more rapidly in the insect

pest. Thus, an increase of oxidase activity in resistant *H. armigera* results in two different consequences, increased degradation of pyrethroids and increased activation of some organophosphates. Therefore, the following resistance management strategy in West Africa was adopted: endosulfan is used for the first two sprays, on the basis that no cross-resistance was detected and for the last four sprays; mixed products containing a pyrethroid in association with an organophosphate were used. This strategy proved successful during the last four years of its widespread use (1999–2001) on the regional scale as there was no longer any field infestation problem due to the bollworm *H. armigera* to such extent that it was difficult to find larvae for laboratory screening [31]. The use of OPs, especially proved to be activated by MFO, in insecticide mixtures would be a useful requirement for pyrethroid resistant management.

The ability to diagnose the precise nature of the mechanisms of resistance was a key component of the resistance management in *H. armigera*. But heliothines are especially flexible in the use of a variety of modifications in all their resistance mechanisms [1]. To keep the advantage in resistance management, it is necessary to rapidly improve understanding of the biochemical and molecular nature of the problem.

Acknowledgments

The authors acknowledge the technical assistance of T. Konate, I. Ouattara, and M.J. Mousso and thank Dr. D. Russell (NRI) and Dr. R.V. Gunning (NSW Agriculture) for their corrections and comments.

References

- [1] A.R. McCaffery, Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 1 (1998) 1735–1750.
- [2] T. Alaux, J.M. Vassal, M. Vaissayre, Suivi de la sensibilité aux pyréthrinoid chez *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) en Côte d'Ivoire, *J. Afr. Zool.* 111 (1) (1997) 63–69.
- [3] J.M. Vassal, M. Vaissayre, T. Martin, Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire, *Resist. Pestic. Manag.* 9 (2) (1997) 14–15.
- [4] M.J. Van Jaarsveld, N.C.J. Basson, P. Marais, Synthetic pyrethroid resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa, *Afr. Plant Prot.* 4 (1998) 15–18.
- [5] O.G. Ochou, T. Martin, N.F. Hala, Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa, in: World Cotton Research Conference No. 2, September 6–12, 1998 Athens, Greece, 1998, pp. 833–837.
- [6] M. Ahmad, R.T. Gladwell, A.R. McCaffery, Decreased nerve insensitivity is a mechanism of resistance in a pyrethroid resistant strain of *Helicoverpa armigera* from Thailand, *Pestic. Biochem. Physiol.* 35 (1989) 165–171.
- [7] R.V. Gunning, C.S. Easton, M.E. Balfe, I.G. Ferris, Pyrethroid resistance mechanisms in Australian, *Heliothis armigera*, *Pestic. Sci.* 33 (1991) 473–490.
- [8] A.J. West, A.R. McCaffery, Evidence for nerve insensitivity to cypermethrin from Indian strains of *Helicoverpa armigera*, in: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases, The British Crop Protection Council, Farnham, UK, 1992, pp. 233–238.
- [9] R.V. Gunning, Bioassay for detecting pyrethroid nerve insensitivity in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *J. Econ. Entomol.* 89 (1996) 817–819.
- [10] A.R. McCaffery, D. Head, J. Tan, A.A. Dubble-dam, V.R. Subramaniam, A. Callaghan, Nerve insensitivity resistance to pyrethroid in heliothine Lepidoptera, *Pestic. Sci.* 44 (1995) 237–247.
- [11] R.R. Kranthi, N.J. Armes, N.G.V. Rao, S. Raj, V.T. Sundaramurthy, Seasonal dynamics of metabolic mechanisms mediating pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* in central India, *Pestic. Sci.* 50 (1997) 91–98.
- [12] R.V. Gunning, G.D. Moores, A. Devonshire, Esterases and esfenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pestic. Biochem. Physiol.* 54 (1996) 12–23.
- [13] R.V. Gunning, A. Devonshire, G.D. Moores, Metabolism of esfenvalerate by pyrethroid-susceptible and -resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pestic. Biochem. Physiol.* 54 (1995) 205–213.
- [14] T. Martin, G.O. Ociou, N.F. Hala, J.M. Vassal, M. Vaissayre, Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa, *Pestic. Manag. Sci.* 56 (2000) 549–554.
- [15] T. Omura, R. Sato, The carbon dioxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2370–2378.
- [16] T.N. Patil, R.A. Morton, R.S. Singh, Characterisation of 7-ethoxycoumarin-*o*-deethylase from malathion resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*, *Insect Biochem.* 20 (1990) 91–98.
- [17] R. Feyereisen, Polysubstrate monooxygenase (cytochrome P450) in larvae of susceptible and resistant

- strains in house flies, *Pestic. Biochem. Physiol.* 19 (1983) 262–269.
- [18] R. Feyereisen, D.R. Vincent, Characterisation of antibodies to house fly NADPH-cytochrome P450 reductase, *Insect Biochem.* 14 (1984) 163–171.
- [19] R.T. Mayer, J.W. Jermyn, M.D. Burke, R.A. Prough, Methoxyresorufin as a substrate for the fluorometric assay of insect microsomal *o*-dealkylases, *Pestic. Biochem. Physiol.* 7 (1977) 349–354.
- [20] W.G. Brogdon, J.C. McAllister, J. Vulule, Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance, *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 13 (1997) 233–237.
- [21] R. Coulloud, M. Giret, Multiplication of *Helicoverpa armigera* (Hübner): possible improvements thanks to the adoption of a group caterpillar rearing method, *Colon et Fibres Trop* 35 (1980) 217–224.
- [22] R.V. Gunning, C.S. Easton, L.R. Greenup, V.E. Edge, Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia, *J. Econ. Entomol.* 77 (1984) 1283–1287.
- [23] J. Hemingway, Field and laboratory manual for the mechanistic detection of insecticide resistance in insects, World Health Organization, unpublished document, 1998, 35 p.
- [24] D.J. Finney, Probit Analysis, third ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1971, 333p.
- [25] Y. Dong, P. Zhuang, Z. Tang, Cytochrome P450 monooxygenase associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Entomol. Sini.* 6 (1999) 92–96.
- [26] J.A. Ottea, A.M. Younis, S.A. Ibrahim, R.J. Young, B.R. Leonard, A.R. McCaffery, Biochemical and physiological mechanisms of pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* (F.), *Pestic. Biochem. Physiol.* 51 (1995) 117–128.
- [27] S.A. Ibrahim, J.A. Ottea, Biochemical and toxicological studies with laboratory and field populations of *Heliothis virescens* (F.), *Pestic. Biochem. Physiol.* 53 (1995) 116–128.
- [28] G. Zhao, R.L. Rose, E. Hodgson, R.M. Roe, Biochemical mechanism and diagnostic microassays for pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticide resistance/cross-resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 56 (1996) 183–195.
- [29] K.S. Lee, C.H. Walker, A. McCaffery, M. Ahmad, E. Little, Metabolism of trans-cypermethrin by *Heliothis armigera* and *Heliothis virescens*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 34 (1989) 49–57.
- [30] R.V. Gunning, A. Devonshire, G.D. Moores, Inhibition of pyrethroid resistance related esterases by piperonyl butoxide in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), in: Piperonyl Butoxide, The Insecticide Synergist, Academic Press, San Diego, 1998, p. 25.
- [31] G.O. Ochou, T. Martin, Impact of resistance management strategies on cotton field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Côte d'Ivoire, West Africa, in: Proceedings of Conference Resistance 2001, Meeting the Challenge, IACR Rothamsted, UK, 24–26 September 2001.

Organophosphorus Insecticides Synergize Pyrethroids in the Resistant Strain of Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa

THIBAUD MARTIN,¹ OCHOU G. OCHOU,² MAURICE VAISSAYRE,³ AND DIDIER FOURNIER⁴

Programme Coton, Centre National de Recherche Agronomique, BP 633 Bouaké, Cote D'Ivoire, West Africa

J. Econ. Entomol. 96(2): 468–474 (2003)

ABSTRACT *Helicoverpa armigera* (Hübner) populations from West Africa recently developed resistance to pyrethroid insecticides through enhanced metabolism by mixed-function oxidases. The combination index method was used to study the synergism of pyrethroids by organophosphorus insecticides. Several mixtures of insecticides currently registered to control cotton pest complex in West Africa were tested, including: cypermethrin/ethion, cypermethrin/profenofos, deltamethrin/triazophos, deltamethrin/chlorpyrifos, cyfluthrin/chlorpyrifos, and betacyfluthrin/chlorpyrifos. In the resistant strain, the organophosphorus insecticides significantly increased the toxicity of pyrethroids suppressing the resistance effect, either by additive or synergistic effects. Significant synergism was shown for the following mixtures: cypermethrin/ethion, deltamethrin/triazophos, and deltamethrin/chlorpyrifos. The use of synergism from these insecticide mixtures should prove to be an additional tool in the overall resistance management strategy because the pyrethroid resistance in *H. armigera* from West Africa is not yet stable, decreasing between cotton seasons and increasing with treatments. In absence of selection, the susceptibility of *H. armigera* to insecticides should be restored.

KEY WORDS *Helicoverpa armigera*, insecticide resistance, insecticide mixtures, cotton, West Africa

IN WEST AFRICA, *Helicoverpa armigera* (Hübner) is an important insect pest of cotton and vegetable crops. Pyrethroids have been essential, because from the early years of the 1980s they are the only registered insecticides that control effectively *H. armigera* and other major cotton pests, such as the red bollworm (*Diparopsis watersi* (Rothschild)), the pink bollworm (*Pectinophora gossypiella* Saunders), and the false codling moth (*Cryptophlebia leucotreta* Meyrick). Pyrethroids are always used in combination with organophosphates (OPs) to control the broad mite (*Polyphagotarsonemus latus* Bank), the sucking pests (*Aphis gossypii* Glover) and (*Bemisia tabaci* (Gennadius)), and the leafworm (*Sylepte derogata* (Fabricius)).

In 1996, after the failure of cotton treatments with pyrethroid insecticides to control *H. armigera*, pyrethroid resistance was diagnosed (Alaux et al. 1997, Vassal et al. 1997). Resistance to pyrethroids in *H. armigera* was reported in Australia (Gunning et al. 1984), Thailand (Ahmad and McCaffery 1988), India (McCaffery et al. 1989), Turkey (Ernst and Ditttrich 1992), Indonesia (McCaffery et al. 1991), and China (Shen et al. 1992). Several resistance mechanisms

have been described, including nerve insensitivity, metabolic detoxification involving oxidases or esterases, and penetration resistance (Gunning et al. 1995, McCaffery 1998). In West Africa, field populations of *H. armigera* were resistant to many pyrethroids but, as yet, they have not been resistant to other classes of insecticides (Ochou and Martin 2001). The resistance mechanism in the deltamethrin-selected strain is the result of an increased metabolic detoxification by the cytochrome P450-dependent monooxygenases (Martin et al. 2002).

Organophosphates synergized pyrethroids against *H. armigera* (Asher et al. 1986, Vaissayre and Lucas-Chauvelon 1989, Goebel and Jacquemard 1990, Martin and Jacquemard 1991). Synergism between OPs and pyrethroids has also been reported in other pyrethroid-susceptible heliothine species, *Heliothis zea* (Boddie) and *H. virescens* (F.) (All et al. 1977). After acquisition of pyrethroid resistance, the synergism between pyrethroid and OP insecticides has also been reported in larvae in the United States (Campanhola and Plapp 1989) where metabolic resistance of the tobacco budworm was mostly a result of enhanced activity of monooxygenases (Zhao et al. 1996) and in Australia (Forrester et al. 1993) where resistance was explained by an increase of esterases activity (Gunning et al. 1999).

This paper addresses the question of synergism between pyrethroid and OP insecticides. Different com-

¹ CIRAD, BP 1465, Bouaké, Cote D'Ivoire, West Africa.

² CNRA, Cotton Program, BP 633, Bouaké, Cote D'Ivoire, West Africa.

³ CIRAD, Annual Crops Department, 34398, Montpellier, France.

⁴ LSPCMB, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France.

binations have therefore been tested at ratios used in cotton fields in susceptible and resistant strains.

Materials and Methods

Insects. The susceptible *H. armigera* strain (BK77) used was originally collected in Côte d'Ivoire, West Africa, in 1977 and reared in the CIRAD Entomological Laboratory, Montpellier, France (Couilloud and Giret 1980). Pyrethroid-resistant strains, BK99R3 and BK99R5, were obtained by retaining the survivors from discriminating dose (0.6 µg/g of larva) applied topically on third-instar larvae for three and five generations of a field population. This strain was collected in October 1999 in the Cotton Research Station of CNRA in Bouaké, Côte d'Ivoire. Larvae were reared on an artificial diet at 25°C, 75% RH, and a photoperiod of 12:12 (L:D) h in the laboratory, as previously described (Martin et al. 2000).

Insecticides. The products used were all technical grade materials. Deltamethrin (99% purity), triazophos (70.6% purity), and triazophos oxon (99% purity) were obtained from Aventis CropScience, Lyon, France. Cyfluthrin (97.2% purity), betacyfluthrin (98.0% purity), and chlorpyrifos ethyl (99.7% purity) were obtained from Dow Agroscience, Sofia Antipolis, France. Cypermethrin (86.04% purity) and ethion (96.25% purity) were obtained from FMC, Philadelphia, PA. Profenofos (90.8% purity) was provided by Syngenta, Abidjan, Côte d'Ivoire. Insecticides were dissolved in acetone and serially diluted.

Bioassays. Standard third-instar topical bioassays were used to determine insecticide toxicity (Entomological Society of America 1970, Gunning et al. 1984, Martin et al. 2000). The same type of bioassays were made with insecticide mixtures. Technical grade products were weighted at ratios used in the field (see Table 2) or at ratio of 1:1 (see Table 4) and dissolved together in acetone. Five serially diluted concentrations were prepared for each insecticide alone and each mixture, taking in account the pyrethroid concentration only. For each concentration, 12 third-instar larvae (35–45 mg) were treated with 1 µl of solution applied on the dorsal surface of the thorax by a microapplicator (Burkhard, Rickmansworth, UK).

Each test was done two times and included acetone-treated controls. After treatment, the tested larvae were provided with adequate food and held individually at 25°C, 75% RH, and at a photoperiod of 12:12 (L:D) h. Mortality was assessed 72 h after treatment. Larvae were considered dead if unable to move in a coordinated way when prodded with a needle.

Statistical Analysis. The Finney (1971) method was used to determine the LD₅₀ of an insecticide. The data were subjected to probit analysis to generate dose mortality regression lines using WinDL software. Mortality in the control was always <10%, data from all bioassays were corrected for control mortality using Abbott's (1925) formula. Resistance levels were determined dividing the LD₅₀ of each resistant strain by the LD₅₀ for the susceptible strain. Differences among

strains and insecticides were considered significant when the 95% CL of the LD₅₀ did not overlap.

Synergism Analysis. Synergism/antagonism in drug interactions can be assessed using various methods (Loewe 1957, Sun and Johnson 1960, Webb 1963, Plackett and Hewlett 1967, Finney 1971, Koziol and Witkowski, 1982, Robertson and Smith 1984, Chou and Talalay 1984). The combination-index method of Chou and Talalay (1984), which is appropriate for analyzing multiple drug effects, was used here. This method is based on the dose effect of each product used in a mixture and alone. The combination index (CI) for quantifying synergism was calculated for each mortality as follows:

$$CI_x = \frac{LD_x^{py(m)}}{LD_x^{py}} + \frac{LD_x^{op(m)}}{LD_x^{op}} + \frac{LD_x^{py(m)}}{LD_x^{py}} \frac{LD_x^{op(m)}}{LD_x^{op}} \quad [1]$$

$LD_x^{py(m)}$ and $LD_x^{op(m)}$ are lethal doses of pyrethroid and OP used in the mixture giving the mortality x ; LD_x^{py} and LD_x^{op} are lethal doses of pyrethroid and OP required to produce the same mortality x when used alone. When two insecticides have an additive effect, the combination index value $CI = 1$. When two insecticides are synergistic, the lethal dose of the mixture is lower than expected and $CI < 1$. When two insecticides are antagonistic, toxicity of the mixture is higher than expected and $CI > 1$. To apply this method, the CalcuSyn software developed by Biosoft (Chou and Hayball 1996) was used. The combination index values (CI), integrating the toxicity of each product in a mixture and their interaction, were calculated at mortality levels of 50 and 90%.

Toxicity of a mixture originates from the sum of the insecticide intrinsic toxicities ($\%M_{py}$ for pyrethroid and $\%M_{op}$ for OP) and any synergistic effect. Intrinsic toxicity was calculated using probit mortality relationship obtained with the insecticide used alone. The toxicity because of the synergism of mixture was estimated as $\%M_{(py+op)} = 100 - (\%M_{py} + \%M_{op})$.

Results

Insecticides. Results of bioassays with organophosphates insecticides are presented in Table 1. One of the organophosphates, chlorpyrifos, showed a slight (RF = 3.2) but significant positive cross-resistance, and should be avoided alone in future treatments. Some of the organophosphates, such as ethion and profenofos, showed no cross-resistance. Interestingly, triazophos showed significant negative cross-resistance (RF = 0.3) but not in its oxon form (RF = 4.2).

Results of the *H. armigera* bioassays with pyrethroids alone and in mixture with OPs are shown in Table 2. The LD₅₀s and LD₉₀s of resistant strains to pyrethroids were significantly different from those of the susceptible strain based on the non overlapping of their 95% confidential limits. Resistance factors were 14-fold, 189-fold, 44-fold, and 20-fold for cypermethrin, deltamethrin, cyfluthrin, and betacyfluthrin, respectively. These variations in resistance factor be-

Table 1. Toxicity of organophosphates insecticides in susceptible (BK77) and resistant (BK99R3 and BK99R5) strains of *H. armigera*

Strain	Active ingredients	N ^a	χ^2	df ^b	Slope \pm SE	LD ₅₀ (95% CL) (μ g/g)	RF ₉₀ ^c	LD ₉₀ (95% CL) (μ g/g)
BK77	ethion	240	4.1	8	2.35 \pm 0.33	1062 (824–1285)	–	3727 (2916–5458)
	profenofos	144	3.4	4	5.14 \pm 0.92	6.840 (6.090–7.682)	–	12.14 (9.412–15.67)
	triazophos	144	0.9	4	2.92 \pm 0.90	104.8 (38.91–144.9)	–	288.2 (214.2–642.2)
	triazophos oxon	168	3.8	5	1.36 \pm 0.49	13.99 (0.078–38.85)	–	122.8 (50.01–358.7)
	chlorpyrifos	144	1.7	4	3.57 \pm 1.21	8.114 (1.808–11.62)	–	18.53 (13.81–29.10)
BK99R3	ethion	144	3.6	4	4.03 \pm 0.72	849 (687–1009)	0.8	1765 (1419–2597)
	profenofos	144	0.2	3	3.61 \pm 0.65	5.349 (4.417–6.429)	0.8	12.11 (9.362–19.59)
BK99R5	triazophos	191	4.6	6	1.96 \pm 0.24	27.82 (18.78–37.66)	0.3	125.1 (91.89–187.9)
	triazophos oxon	167	4.6	5	1.76 \pm 0.26	60.46 (36.92–84.31)	4.3	321.9 (232.2–519.9)
	chlorpyrifos	169	5.6	5	4.64 \pm 0.72	25.82 (20.59–30.11)	3.2	48.76 (42.09–59.86)

^a Number of larvae tested.^b Degree of freedom.^c Resistance factor = LD₅₀ resistant strain/LD₅₀ susceptible strain.

tween pyrethroids may be attributable to selection with deltamethrin only.

Pyrethroids/OPs Mixtures. In the susceptible strain (BK77), the toxicity of some pyrethroids, based on their LD₅₀s and LD₉₀s, were found to be significantly higher when combined with some OP insecticides (Table 2). This effect was observed for the following mixtures: cypermethrin/ethion, cypermethrin/profenofos, deltamethrin/triazophos, and betacyfluthrin/chlorpyrifos. However, this effect was not observed with other mixtures tested, including deltamethrin/chlorpyrifos and cyfluthrin/chlorpyrifos.

In the resistant strains, addition of an organophosphorus insecticide significantly increased the toxicity at LD₅₀ and LD₉₀ levels and suppressed a large part of the pyrethroid resistance, regardless of the pyrethroid used (Table 2). The highest synergistic effects were

obtained with deltamethrin, in which the LD₅₀ decreased from 10.40 μ g/g when used alone to 0.450 μ g/g and 0.682 μ g/g when used in mixture with triazophos and chlorpyrifos, respectively. The lowest synergistic effect was observed for cypermethrin, whose LD₅₀ decreased from 3.657 μ g/g when used alone to 0.435 μ g/g and 0.535 μ g/g when used in mixture with ethion and profenofos, respectively. Similar results were found at LD₉₀s levels of the mixtures (Table 2). Resistance, however, was never completely suppressed, because the resistance factor of mixtures varied between 6 and 26. To assess interactions in terms of synergism/antagonism, combination indexes were calculated for each mixture (Table 3), as well as the percentage of mortality of each product used alone and in combination at LD₅₀ and LD₉₀ levels.

For the susceptible strain BK77, when cypermethrin and ethion were mixed at the ratio of 1:10, the

Table 2. Toxicity of pyrethroids alone and in combination with organophosphates in susceptible (BK77) and resistant (BK99R3 and BK99R5) strains of *H. armigera*, at ratios used in cotton field

Strain	Active ingredients	Ratio ^a	N ^b	χ^2	df ^c	Slope \pm SE	LD ₅₀ ^d (95% CL) (μ g/g)	RF ₉₀ ^e	LD ₉₀ ^d (95% CL) (μ g/g)
BK77	cypermethrin	1:0	144	3.5	4	3.56 \pm 0.66	0.257 (0.206–0.299)	–	0.589 (0.477–0.874)
	cypermethrin + ethion	1:10	144	1.4	4	3.48 \pm 0.79	0.077 (0.039–0.107)	–	0.180 (0.135–0.258)
	cypermethrin + profenofos	1:10	144	1.0	4	3.22 \pm 0.90	0.094 (0.042–0.131)	–	0.235 (0.174–0.431)
	deltamethrin	1:0	360	4.9	9	2.16 \pm 0.28	0.055 (0.043–0.066)	–	0.214 (0.165–0.320)
	deltamethrin + triazophos	1:20	216	1.1	4	2.24 \pm 0.46	0.017 (0.010–0.024)	–	0.017 (0.010–0.024)
	deltamethrin + chlorpyrifos	1:25	168	3.7	5	2.07 \pm 0.35	0.044 (0.020–0.070)	–	0.183 (0.125–0.283)
	cyfluthrin	1:0	195	0.8	3	2.95 \pm 0.61	0.067 (0.037–0.091)	–	0.182 (0.138–0.268)
	cyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	196	2.3	4	3.27 \pm 0.54	0.069 (0.057–0.083)	–	0.172 (0.134–0.264)
	betacyfluthrin	1:0	215	0.5	3	3.51 \pm 0.69	0.099 (0.064–0.127)	–	0.231 (0.186–0.319)
	betacyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	168	4.6	5	2.67 \pm 0.60	0.034 (0.011–0.056)	–	0.104 (0.067–0.145)
BK99R3	cypermethrin	1:0	144	3.0	3	1.69 \pm 0.30	3.657 (1.413–6.195)	14	2.096 (1.400–33.64)
	cypermethrin + ethion	1:10	144	1.4	3	2.69 \pm 0.48	0.435 (0.316–0.569)	6	1.303 (0.931–2.367)
	cypermethrin + profenofos	1:10	264	3.9	5	2.78 \pm 0.43	0.535 (0.421–0.657)	6	1.546 (1.174–2.425)
BK99R5	deltamethrin	1:0	264	11	8	2.45 \pm 0.37	10.40 (6.44–14.07)	189	34.75 (27.14–47.34)
	deltamethrin + triazophos	1:20	168	5.1	5	2.32 \pm 0.33	0.450 (0.298–0.605)	26	0.450 (0.298–0.605)
	deltamethrin + chlorpyrifos	1:25	168	1.0	5	5.42 \pm 0.92	0.682 (0.512–0.809)	16	1.176 (1.021–1.379)
	cyfluthrin	1:0	140	4.4	4	1.86 \pm 0.50	2.948 (0.945–4.691)	44	14.36 (9.258–39.05)
	cyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	144	0.3	4	3.05 \pm 0.41	0.712 (0.536–0.891)	10	1.875 (1.483–2.574)
	betacyfluthrin	1:0	144	3.8	3	2.99 \pm 0.59	1.946 (0.965–2.803)	20	5.224 (3.858–7.152)
	betacyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	144	0.5	3	2.82 \pm 0.74	0.433 (0.187–0.621)	13	1.233 (0.891–2.244)

^a Ratio pyrethroid/organophosphate.^b Number of larvae tested.^c Degree of freedom.^d For the mixtures, LD₅₀ and LD₉₀ are calculated for pyrethroid only.^e Resistance factor = LD₅₀ resistant strain/LD₅₀ susceptible strain.

Table 3. Combination index and synergistic mortalities for pyrethroid + organophosphate mixtures in susceptible (BK77) and resistant (BK99R3 and BK99R5) strains of *H. armigera*

Strain	Active ingredient	Ratio ^a	At LD ₅₀ level			At LD ₉₀ level		
			CI ₅₀ ^b ± SE	%M _{py} ^c	%M _{op} ^c	%M _{py} ^c	%M _{op} ^c	%M _(py + op) ^d
BK77	cypermethrin + ethion	1:10	0.31 ± 0.03	6.6	0	37.3	0	27.3
	cypermethrin + profenofos	1:10	0.51 ± 0.04	12.4	0	50.8	1.1	48.1
	deltamethrin + triazophos	1:20	0.33 ± 0.03	27.0	0	61.8	0	38.2
	deltamethrin + chlorpyrifos	1:25	0.91 ± 0.11	78.8	0.2	92.5	13.6	0
	cyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	1.24 ± 0.12	102	1.6	95.2	13.6	0
BK99R3	betacyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	0.47 ± 0.05	12.2	0	56.5	3.9	39.6
	cypermethrin + ethion	1:10	0.13 ± 0.01	22.4	0	33.0	0	67.0
	cypermethrin + profenofos	1:10	1.05 ± 0.13	26.0	43.8	37.6	100	0
BK99R5	deltamethrin + triazophos	1:20	0.38 ± 0.09	0	17.8	1.6	57.8	40.6
	deltamethrin + chlorpyrifos	1:25	0.73 ± 0.05	0.4	40.2	1.0	61.9	37.1
	cyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	0.93 ± 0.07	24.8	44.2	36.0	93.0	0
	betacyfluthrin + chlorpyrifos	1:25	0.65 ± 0.05	4.8	7.4	29.7	69.2	1.1

^a Ratio: pyrethroid/organophosphate.^b CI₅₀ and CI₉₀ are combination indexes at 50% and 90% mortality level.^c %M_{py} and %M_{op} are the percentages of mortality for the pyrethroid and the organophosphate respectively when they are used alone.^d %M_(py + op) is the percentage of mortality due to the synergism of the mixture (%M_(py + op) = 100 - %M_{py} - %M_{op}).

CI₅₀ (0.31) was significantly below 1, indicating synergism (Table 3). At the LD₅₀ value of the mixture, the toxicity associated with cypermethrin alone was 6.6% and 0% for ethion alone (ethion being not toxic at the dose used, 0.77 µg/g). Thus, the synergistic effect of the mixture was 93.4% of the observed mortality. A similar synergistic effect was found at the LD₉₀ level but the mortality as a result of the synergism was lower (27.3%). CIs were significantly below 1 for cypermethrin/profenofos, deltamethrin/triazophos, and betacyfluthrin/chlorpyrifos, revealing a significant synergism (Table 3). By contrast, the CIs were not significantly different from 1 for deltamethrin/chlorpyrifos and cyfluthrin/chlorpyrifos, indicating that insecticides in mixtures had only additive effects.

The synergistic effect of OP compounds in combination with pyrethroids was evident in the resistant strains BK99R3 and BK99R5 (Table 3). CI₅₀ and CI₉₀ were significantly below 1, revealing a synergism for the cypermethrin/ethion, deltamethrin/triazophos, and deltamethrin/chlorpyrifos mixtures (Table 3). By contrast, an additive effect was obtained for cypermethrin/profenofos, cyfluthrin/chlorpyrifos, and betacyfluthrin/chlorpyrifos mixtures, because CI₅₀ and CI₉₀ were not significantly different from 1. Thus the cypermethrin/profenofos mixture provided a synergistic effect on the susceptible strain and an additive effect for the resistant strain. By contrast, the deltamethrin/chlorpyrifos mixture showed an additive effect on the susceptible strain and a synergistic effect on the resistant strain.

Most OPs are thiophosphates, activated by oxidases to an oxon form. Because monooxygenases activity was involved in the pyrethroid resistance mechanism of *H. armigera* BK99R5 strain (manuscript submitted), we compared the synergistic effect of a thiophosphate (triazophos) with its active form (triazophos oxon) using deltamethrin. Toxicities of deltamethrin mixed with either triazophos or triazophos oxon at the ratio 1:1 were compared with the toxicity of deltamethrin alone (Table 4). Triazophos and its oxon form were not toxic at the doses used (Tables 1 and 5). In the susceptible strain BK77, there was no significant difference between the LD₅₀s of deltamethrin alone (0.055 µg/g) and deltamethrin mixed with triazophos (0.042 µg/g). In contrast, triazophos oxon increased the toxicity 42-fold when mixed with deltamethrin (LD₅₀ = 0.0013 µg/g). Thus, triazophos oxon is a better synergist than triazophos for the susceptible strain. The reverse was found for the resistant strain BK99R5, in which triazophos significantly increased the toxicity of deltamethrin used in mixture, compared with deltamethrin alone but not triazophos oxon. In the resistant strain, synergism by triazophos practically suppressed the deltamethrin resistance because it reduced the deltamethrin resistance factor from 189 to 18 at the LD₅₀ at the 1:1 ratio (Table 4).

Analysis of combination indexes calculated for deltamethrin mixed either with triazophos or triazophos oxon at the same ratio (1:1) leads to the same conclusion (Table 5). High synergism was shown between deltamethrin and triazophos oxon for the susceptible

Table 4. Toxicity of deltamethrin alone and mixed with either triazophos or triazophos oxon in susceptible (BK77) and resistant (BK99R5) strains of *H. armigera*

Strain	Active ingredients	Ratio ^a	N ^b	χ^2	df ^c	Slope \pm SE	LD ₅₀ ^d (95% CL) (μ g/g)	RF ₅₀ ^e	LD ₉₀ ^d (95% CL) (μ g/g)
BK77	deltamethrin	1:0	360	4.9	9	2.16 \pm 0.29	0.055 (0.043–0.066)	–	0.214 (0.165–0.320)
	deltamethrin + triazophos	1:1	226	3.1	4	2.43 \pm 0.48	0.042 (0.025–0.056)	–	0.140 (0.102–0.245)
	deltamethrin + triazophos oxon	1:1	120	1.2	3	1.50 \pm 0.71	0.0013 (0.0001–0.0035)	–	0.009 (0.003–0.393)
BK99R5	deltamethrin	1:0	264	10.7	8	2.44 \pm 0.37	10.40 (6.45–14.07)	189	34.74 (27.14–47.34)
	deltamethrin + triazophos	1:1	144	2.1	4	2.63 \pm 0.41	0.763 (0.478–1.036)	18	2.346 (1.793–3.288)
	deltamethrin + triazophos oxon	1:1	180	1.4	3	1.63 \pm 0.50	3.833 (0.515–6.885)	2948	23.40 (14.95–72.31)

^a Ratio pyrethroid/organophosphate.

^b Number of larvae tested.

^c Degree of freedom.

^d For the mixtures, LD₅₀ and LD₉₀ are calculated for deltamethrin only.

^e Resistance factor = LD₉₀ resistant strain/LD₅₀ susceptible strain.

strain (BK77) and for deltamethrin and triazophos for the resistant strain (BK99R5).

Discussion

In *H. armigera*, the toxicity of pyrethroids can be significantly increased by the addition of an OP insecticide. This increase is sometimes because of an additive effect, although for most of combinations, it was not explained by addition of the two toxic components only. Thus, the remaining toxicity originates from a synergism between the two pesticides. In the susceptible strain, OPs were used at low doses that were not toxic, thus, the toxicity increase can be entirely attributed to synergistic effects. In the resistant strain, higher doses of pyrethroids were used to kill the insect, consequently higher doses of OPs were used and the mortalities in the mixtures were a result of both additive and synergistic effects.

The synergistic effect depended on pyrethroids, OPs, and strains. In the susceptible strain, synergism was observed with the cypermethrin/ethion, cypermethrin/profenofos, and betacyfluthrin/chlorpyrifos combinations. In the resistant strain, strong synergism was observed with the cypermethrin/ethion, deltamethrin/triazophos, and deltamethrin/chlorpyrifos combinations.

A previous study on Australian *H. armigera* (Forrester et al. 1993) found that fenvalerate was synergized by OPs. According to Gunning et al. (1999), this type of synergism is explained by inhibition of esterases activity by OPs, which bind to esterases involved in the pyrethroid resistance mechanisms of

H. armigera from Australia. Synergism by oxon forms of OPs may be indicative that this esterases suppression causes synergism in the susceptible strain. Profenofos was found to synergize cypermethrin in the susceptible strain. This OP is a phosphate that is an active form, able to inhibit the acetylcholinesterase and other esterases. Binding to esterases, profenofos phosphorylates the active serine. Thus, one OP molecule inhibits one esterase molecule. Triazophos oxon has the same synergistic effect as profenofos, strongly synergizing deltamethrin in the susceptible strain presumably by inhibiting esterases.

This mechanism also applies to thiophosphates because they are transformed to oxons by oxidases (Champ 1985). However, if this mechanism explains the fact that triazophos oxon is a better synergist than triazophos in the susceptible strain, it cannot explain the finding that triazophos was a better synergist than triazophos oxon in the *H. armigera* pyrethroid-resistant strain from West Africa. One explanation is that the monooxygenases, which are overproduced in the resistant strain (manuscript submitted), activate the phosphorothioate OPs through oxidative desulfuration (the activation of P = S to P = O) to toxic oxon analogues (Champ 1985). Additionally, the two pesticides (pyrethroid and OP) may be competitive substrates for the same oxidase. Consequently, in the resistant strain, binding of OP to monooxygenases firstly activates the molecule and secondly may prevent binding and degradation of pyrethroid by monooxygenases.

However, we cannot exclude possibility of involvement of monooxygenases without the OP activation as

Table 5. Combination index, intrinsic, and synergistic mortalities for deltamethrin mixed with either triazophos or triazophos oxon (at ratio of 1:1) in susceptible (BK77) and resistant (BK99R5) strains of *H. armigera*

Strain	Active ingredient	At LD ₅₀ level				At LD ₉₀ level			
		CI ₅₀ ^a \pm SE	%M _{py} ^b	%M _{op} ^b	%M _(py + op) ^c	CI ₉₀ ^a \pm SE	%M _{py} ^b	%M _{op} ^b	%M _(py + op) ^c
BK77	deltamethrin + triazophos	0.77 \pm 0.07	76.8	0	23.2	0.60 \pm 0.09	90.8	0	9.2
	deltamethrin + triazophos oxon	0.02 \pm 0.003	0	0	100	0.04 \pm 0.009	3.4	0	96.5
BK99R5	deltamethrin + triazophos	0.10 \pm 0.01	0.4	0	99.6	0.08 \pm 0.01	4.4	1.5	94.1
	deltamethrin + triazophos oxon	0.36 \pm 0.05	31.2	3.8	65.0	0.48 \pm 0.13	76.1	27.3	0

^a CI₅₀ and CI₉₀ are combination indexes at 50% and 90% mortality level.

^b %M_{py} and %M_{op} are the percentages of mortality for the pyrethroid and the organophosphate, respectively, when they are used alone.

^c %M_(py + op) is the percentage of mortality due to the synergism of the mixture (%M_(py + op) = 100 – %M_{py} – %M_{op}).

a contributor to synergism. Monooxygenases attack on OP could also lead to nontoxic metabolites via hydroxylation of either the thioate or the oxon forms, followed by degradation of oxidative ester cleavage. Monooxygenases action on the OP would prevent degradation of the pyrethroid, hence providing a level of synergism by competitive substrate inhibition (Kulkarni and Hodgson 1980, Feyereisen 1999).

As our results show, pyrethroid activity against *H. armigera* can be enhanced by organophosphate insecticides. Furthermore, among pyrethroid-organophosphate mixtures, the cypermethrin-profenofos association appeared to be the best mixture for the susceptible strain. This mixture, however, has lost efficacy with the occurrence of pyrethroid resistance in *H. armigera*. Consequently, the pyrethroid-triazophos association appeared to be the best mixture to revert the resistance in *H. armigera*. The actual resistance management strategy initiated in West Africa since 1998 and which is based on the use of nonpyrethroid insecticides at the early cotton season (Ochou et al. 1998), should emphasize the use of pyrethroid/triazophos mixtures.

Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of T. Konate, I. Ouattara, and M. J. Mouso, and thank D. Russell (NRI), R. V. Gunning (NSW Agriculture), and T. C. Chou (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) for their reviews and comments on the manuscript.

References Cited

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Alaux, T., J.-M. Vassal, and M. Vaissayre. 1997. Suivi de la sensibilité aux pyréthrinoides chez *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) en Côte d'Ivoire. *J. African Zool.* 111: 63-69.
- All, J. N., M. Ali, E. P. Hornyak, and J. B. Weaver. 1977. Joint action of two pyrethroids with methyl-parathion, methomyl, and chlorpyrifos on *Heliothis zea* and *H. virescens* in the laboratory and in cotton and sweetcorn. *J. Econ. Entomol.* 70: 813-817.
- Ahmad, M., and A. R. McCaffery. 1988. Resistance to insecticides in Thailand strain of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 81: 45-48.
- Anonymous. 1970. Standard method for detection of insecticide resistance in *Heliothis zea* (Boddie) and *H. virescens* (F.). *Bull. Entomol. Soc. Am.* 16: 147-153.
- Asher, K.R.S., M. Eliyahu, I. Ishaaya, M. Zur, and E. Ben-Moshe. 1986. Synergism of pyrethroid-organophosphorus insecticide mixtures in insects and their toxicity against *Spodoptera littoralis* larvae. *Phytoparasitica* 14: 101-110.
- Campanhola, C., and F. W. Plapp, Jr. 1989. Toxicity and synergism of insecticides against susceptible and pyrethroid-resistant third instars of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1495-1501.
- Champ, P. 1985. Mode d'action et utilisation des organophosphorés, pp. 225-245. Colloque national, mode d'action et utilisation des insecticides, 19-22 November 1985. Angers, France.
- Chou, T. C., and P. Talalay. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enz. Regul.* 22: 27-55.
- Chou, T. C., and M. P. Hayball. 1996. ClacuSyn: Windows software for dose effect analysis. Published and distributed by Biosoft.
- Couilloud, R., and M. Giret. 1980. Multiplication of *Helicoverpa armigera* Hübner: possible improvements thanks to the adoption of a group caterpillar rearing method. *Cot. Fib. Trop.* 35: 217-224.
- Ernst, G., and V. Ditttrich. 1992. Comparative measurements of resistance to insecticides in three closely related Old and New World bollworm species. *Pestic. Sci.* 34: 147-152.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 507-533.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Forrester, N. W., M. Cahill, L. J. Bird, and J. K. Layland. 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res. Supplement Series N° 1*. 132 pp.
- Goebel, R., and P. Jacquemard. 1990. Evaluation du niveau de sensibilité de *H. armigera* Hubner, déprédateur de la capsule du cotonnier aux associations cyperméthrine-chlorpyrifos et cyperméthrine-méthyl parathion. Etude des interactions possibles entre ces insecticides. *Cot. Fib. Trop.* 45: 137-143.
- Gunning, R. V., C. S. Easton, L. R. Greenup, and V. E. Edge. 1984. Synthetic pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77: 1283-1287.
- Gunning, R. V., A. L. Devonshire, and G. D. Moores. 1995. Metabolism of esfenvalerate by pyrethroid-susceptible and -resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest. Biochem. Physiol.* 54: 205-213.
- Gunning, R. V., G. D. Moores, and A. L. Devonshire. 1999. Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest. Biochem. Physiol.* 63: 52-62.
- Kozioł, F. S., and J. F. Witkowski. 1982. Synergism studies with binary mixtures of permethrin plus methyl parathion, chlorpyrifos, and malathion on European corn borer larvae. *J. Econ. Entomol.* 75: 28-30.
- Kulkarni, A. P., and E. Hodgson. 1980. Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems. *Pharmacol. Ther.* 8: 379-475.
- Loewe, S. 1957. Antagonism and antagonists. *Pharmacol. Rev.* 9: 237-242.
- Martin, T., and P. Jacquemard. 1991. Mesure de la sensibilité de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) et *Heliothis armigera* (Hübner) vis à vis du fenvalerate, de cinq organophosphorés et de leurs associations. *Cot. Fib. Trop.* 46: 5-13.
- Martin, T., G. O. Ochou, N. F. Hala, J.-M. Vassal, and M. Vaissayre. 2000. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), in West Africa. *Pest Manag. Sci.* 56: 549-554.
- Martin, T., G. O. Ochou, M. Vaissayre, and D. Fournier. 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pest. Biochem. Physiol.* 74: 17-26.
- McCaffery, A. R., A.B.S. King, A. J. Walker, and H. El-Nayir. 1989. Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm *Heliothis armigera* from Andhra Pradesh, India. *Pestic. Sci.* 27: 65-76.

- McCaffery, A. R., A. J. Walker, and C. P. Topper. 1991. Insecticide resistance in the bollworm *Heliothis armigera* from Indonesia. *Pestic. Sci.* 31: 41-52.
- McCaffery, A. R. 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1735-1750.
- Ochou, O. G., T. Martin, and N. F. Hala. 1998. Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa, pp. 833-837. In *World Cotton Research Conference No. 2*, 6-12 September 1998 Athens, Greece.
- Ochou, O. G., and T. Martin. 2001. Impact of resistance management strategies on cotton field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in Côte d'Ivoire, West Africa. In *Proceedings of Conference Resistance 2001, Meeting the Challenge*, IACR Rothamsted, 24-26 September, UK.
- Plackett, R. L., and P. S. Hewlett. 1967. A comparison of two approaches to the construction of models for quantal responses to mixtures of drugs. *Biometrics* 27: 45.
- Robertson, J. L., and K. C. Smith. 1984. Joint action of pyrethroid with organophosphorus and carbamate insecticides applied to western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 77: 16-22.
- Shen, J., J. Tan, B. Zhou, C. Jin, and F. Tan. 1992. Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *Resist. Pest. Manag.* 4: 22-24.
- Sun, Y.-P., and E. R. Johnson. 1960. Analysis in joint action of insecticides against house flies. *J. Econ. Entomol.* 53: 887-892.
- Vaissayre, M., and J. Lucas-Chauvelon. 1989. Toxicité de diverses associations entre pyrèthrinoides et organophosphorés vis à vis d'*Helicoverpa armigera* Hbn, pp. 357-360. In *Proceedings, 1st African Cotton Research Conference*, vol. 2, 31 January-2 February 1989, Lomé, Togo.
- Vassal, J.-M., M. Vaissayre, and T. Martin. 1997. Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. *Resist. Pest. Manag.* 9: 14-15.
- Webb, J. L. 1963. Effect of more than one inhibitor, pp. 66-79. In *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Academic Press, New York.
- Zhao, G., R. L. Rose, E. Hodgson, and R. M. Roe. 1996. Biochemical mechanism and diagnostic microassays for pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticide resistance/cross-resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 56: 183-195.

Received for publication 12 June 2002; accepted 14 October 2002.



Pergamon

Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (2003) 883–887

*Insect
Biochemistry
and
Molecular
Biology*

www.elsevier.com/locate/ibmb

Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hübner) to triazophos in West Africa

Thibaud Martin ^{a,*}, Ochou G. Ochou ^b, Maurice Vaissayre ^a, Didier Fournier ^c

^a CIRAD-CA, 34398, Montpellier, France

^b Cotton Program of CNRA, BP 633, Bouaké, Ivory Coast

^c IPBS-UMR 5089, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

Received 4 March 2003; received in revised form 27 May 2003; accepted 3 June 2003

Abstract

Helicoverpa armigera (Hübner) is the major insect pest of cotton in Africa, Turkey, Asia, India, Indonesia and Australia. Populations recently developed resistance to pyrethroids in West Africa via the overproduction of cytochrome P450 (oxidases) increasing pyrethroid metabolism. One way to overcome pyrethroid resistance is to use compounds that show negative cross-resistance to pyrethroids. Triazophos is one of these compounds: it is slightly more toxic against pyrethroid resistant larvae of *H. armigera* than against susceptible ones. Overproduced oxidases transform the non active triazophos into its active form, triazophos-oxon, since this form was significantly more often found in larvae from pyrethroid resistant strain (23%) than in susceptible strain (15%). This suggests that oxidases, which provide resistance by degradation of pyrethroids in the resistant individuals, also activate triazophos in its toxic oxon form resulting in a negative cross-resistance.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Insecticide resistance; *Helicoverpa armigera*; Oxidases; Triazophos

In West Africa, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is an important pest of cotton and vegetable crops. Pyrethroids have been used for control in the field since the beginning of 1980's. In 1996, following the failure of treatments to control *H. armigera*, pyrethroid resistance was diagnosed (Vassal et al., 1997; Martin et al., 2000). One more treatment, corresponding to 20% increase of the cotton protection cost, had cost \$10 M for the 2 million small-scale farmers. Resistance has originated from an increase metabolic detoxification due to cytochrome P450 (oxidases) overproduction (Martin et al., 2002a). No other pyrethroids resistance mechanisms, such as the esterase metabolism or the insensitive target site (*Kdr*) were found in West African *H. armigera*, although such mechanisms were evidenced in *H. armigera* from other parts of the world (McCaffery, 1998).

Utilization of compounds showing negative cross-resistance to pyrethroids is a strategy which can be used to control resistant pest and hopefully to revert the resistance allowing the possibility to use pyrethroids again. Thus field sprays with such compounds would select for pyrethroid susceptible individuals in the population and in turn, decrease pyrethroids resistance. We screened 22 insecticides for cross-resistance to pyrethroids in *H. armigera*. Two organophosphorus compounds, triazophos and acephate, revealed a negative cross-resistance (Martin et al., 2002b).

Only few cases of negative cross-resistance have been described. Most of them are all related to modification of the organophosphate insecticide (OP) target, acetylcholinesterase (AChE). Point mutations which provide resistance to some OPs resulted in sensitivities to other molecules (Hama and Iwata, 1978; Kyomura and Takahashi, 1979; Brown and Bryson, 1992; Zhu and Clark, 1994; Villatte et al., 1999). Another case is related to an increase susceptibility of adults in a pyrethroid resistant strain of *Heliothis virescens* to chlorfenapyr which could be bioactivated by cyt-P450 overexpressed in the resist-

* Corresponding author. Tel.: +33-499-623-318, fax: +33-467-615-666.

E-mail address: thibaud.martin@cirad.fr (T. Martin).

ant strain (Pimprale et al., 1997). Identically, as most OPs are pro-insecticides which require oxidase-mediated activation, some authors suggested that overproduction of oxidases may also activate OPs and increase their toxicity (Forrester et al., 1993; Scott, 1999).

In the present paper, we tested this hypothesis. As pyrethroid resistant *H. armigera* overproduced oxidases, we measured the amount of the oxidatively desulfurated form of triazophos (triazophos-oxon) in pyrethroid susceptible and resistant larvae. Our results show that amount of triazophos-oxon was higher in resistant larvae than in susceptible larvae, strengthening the hypothesis that anti-resistance may originate from the activation of OPs by oxidases.

1. Materials and methods

1.1. Insects, insecticides and bioassays

The susceptible *H. armigera* strain used (BK77) was originally collected in Côte d'Ivoire in 1977 and reared in the CIRAD Entomological Laboratory in Montpellier, France. The resistant strain BK99R9 was collected as larvae from cotton crops in the same area, in 1999 and subsequently homogenized for deltamethrin resistance for nine generations. The deltamethrin resistance ratio of BK99R9 was 189 compared to the susceptible strain BK77. Larvae were reared on artificial diet at 25 °C, 75% humidity and at photoperiod of 12/12 h in the laboratory. Triazophos (70.6%) and triazophos-oxon (99%) were obtained from Aventis CropScience, Lyon, France. Triazophos was devoid of detectable triazophos-oxon.

Standard third-instar larvae topical bioassays were used to determine triazophos toxicity. Five serially diluted concentrations were prepared. For each concentration, 10 third-instar larvae (35–45 mg) were treated with 1 µL of solution applied by a microapplicator to the thorax. Each test was replicated 3 times and included acetone-treated controls. Mortality in the controls was less than 10%. After dosage, the test larvae were held individually at 25 °C and 75% humidity. Mortality was assessed 72 h after treatment. Larvae were considered dead if unable to move in a coordinated way when prodded with a needle. In order to determine the LD₅₀ (50% lethal dose) of insecticides, the Finney (1971) method was used. The doses and mortality percentages were converted and the slopes of the response curves were estimated by probit analysis. Differences among strains and insecticides were considered significant when the 95% confidence limits between LD₅₀ did not overlap.

1.2. Oxidase assay

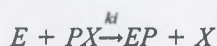
Oxidases were quantified in individual larvae of susceptible and resistant strains of *H. armigera* as described in Martin et al. (2002a).

1.3. Extraction of triazophos-oxon

Third-instar larvae (35–45 mg) were treated with 5 µg/g insect (840 picomoles) of triazophos as applied in 1 µL of acetonic solution on the thorax with a microapplicator. This treatment was not toxic. Insects were maintained at 25 °C on artificial diet for 1, 3, 6, 12 or 18 h and then frozen at –70 °C before use. Each larva was ground in 200 µL 25 mM phosphate buffer pH7 and centrifuged at 10,000 g during 5 min to discard unsolubilized materials. Triazophos-oxon was extracted by two successive phase separations with 200 µL chloroform. The two pooled organic phases were dried under vacuum and dried material was re-suspended in 50 µL ethanol.

1.4. Quantification of triazophos-oxon

Triazophos does not inhibit AChE and it is bioactivated by P450 enzymes through oxidative desulfuration (the activation of P=S to P=O) to its toxic oxon analog. Thus inhibition of AChE allowed estimating the amount of triazophos-oxon in the sample whatever the amount of triazophos. The mechanism of inhibition of AChE by organophosphate compounds with the bimolecular rate constant k_i is (Aldridge, 1950):



With E = enzyme, PX = organophosphate, X = leaving group. Triazophos-oxon phosphorylates the active site serine, and the inhibition can be considered as irreversible in the first 30 min. Disappearance of free enzyme ($[E]$) or disappearance of organophosphorus compound ($[PX]$) follows second order kinetics.

$$v = -\frac{d[E]}{dt} = -\frac{d[PX]}{dt} = k_i \cdot [E] \cdot [PX]$$

Integration of this equation indicates the remaining activity with time gives Eq. (1) when $[E_0]$ is different from $[PX_0]$:

$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{([PX_0] - [E_0]) \cdot e^{-k_i \cdot t \cdot ([PX_0] - [E_0])}}{[PX_0] - [E_0] \cdot e^{-k_i \cdot t \cdot ([PX_0] - [E_0])}} \quad (1)$$

Where t represents the time of incubation, $[PX_0]$ and $[E_0]$ are initial concentrations of inhibitor and enzyme respectively; $[PX]$ and $[E]$ are concentrations of inhibitor and enzyme at different times. In this equation, $[E_0]$, $[PX]$ and k_i are unknown. As $[E_0]$ and k_i are known, only one unknown parameter remains in this equation: $[PX_0]$. Estimation of variables was performed by multiple non-linear regression on Eq. (1).

Purified recombinant acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* (Estrada-Mondaca and Fournier, 1998) was used to quantify the amount of triazophos-oxon by following the inhibition of the enzyme by the

extract. Kinetics of inhibition was followed by incubating the enzyme for various times with triazophos at 25 °C in 25 mM phosphate buffer pH7. The variation of the remaining free enzyme with time was estimated by sampling aliquots at various times and recording the remaining activity with 1 mM acetylthiocholine (Ellman et al., 1961). A Wilcoxon unilateral test was used to check the difference of larvae with and without triazophos-oxon in the two populations based on Minitab software.

2. Results

2.1. Bioassays

The LD₅₀s of triazophos on third-instar larvae of *H. armigera* were 104.9 (39.0–144.9) µg/g larva for the susceptible strain BK77 and 27.8 (18.8–37.7) µg/g larva for the deltamethrin-resistant strain BK99R9. Regression lines are illustrated in Fig. 1. The strain BK99R9 was significantly 3-fold more sensitive to triazophos than BK77. Thus triazophos showed a negative cross-resistance with pyrethroid.

2.2. Oxidases

The mean oxidases amount in individual insects was significantly different between the susceptible BK77 and the pyrethroid resistant strain BK99R9 (Martin et al., 2002a). The oxidases amount was higher in the 75% of resistant larvae than in the larvae from susceptible strain.

2.3. Calibration: estimation of AChE amount ([E₀]) and rate of inhibition (k_i)

The solution of AChE which will be used to estimate the amount of AChE in larvae had first to be characterized for two parameters: amount of AChE and sensitivity to triazophos-oxon. The solution was mixed with

triazophos-oxon and variation of remaining active enzyme ([E]/[E₀]) was estimated with time (*t*). Data were fitted on Eq. (1) (Fig. 2) to estimate the rate constant of the reaction (k_i) which was estimated to 503 ± 33 L.µmole⁻¹ min⁻¹. Thus triazophos-oxon was found to be a good inhibitor of *Drosophila* AChE allowing us to use it as titrating agent since after 2 min incubation of the inhibitor with the enzyme, all the molecules of inhibitor reacted with the enzyme. By comparison, the rate constant was 184 L.µmole⁻¹ min⁻¹ for the titrating agent MEPQ (7-(methylethoxy-phosphinyloxy)-1-methyl-quinolinium iodide) and 1.5 for paraoxon (Charpentier et al., 2000). Same fit allowed to estimate E₀, the AChE amount in the solution to 12 ± 1 picomoles.ml⁻¹. It corresponds to the minimum amount of triazophos-oxon to add in the solution to inhibit all the enzyme molecules (Fig. 2).

2.4. Estimation of triazophos-oxon in larvae

The *Drosophila* AChE solution was used to estimate the amount of triazophos-oxon in individual larvae of *H. armigera*. Aliquots of extracts were incubated with the AChE solution and remaining active enzyme was recorded with time. Data were then fitted on Eq. (1) considering the concentration of the enzyme E₀ (12 picomoles.ml⁻¹) and k_i (503 L.µmole⁻¹ min⁻¹) as constants. Thus only the concentration of triazophos-oxon in the extracts ([PXo]) remained to be estimated. The limit of the detection method has been estimated to be 0.3 picomole in a one-milliliter solution.

Triazophos-oxon was detected from 1–12 h after treatment with a maximum at 3 and 6 h but never after 18 h incubation. In each strain, 106 larvae were analyzed 1, 3, 6 or 12 h after the treatment for triazophos-oxon amount and data were pooled together for analysis. The proportion of larvae with detectable triazophos-oxon (>0.3 picomole by larvae) was significantly higher (*P* = 0.047) in BK99R9 strain (23%) than in BK77 strain (15%). This suggests that the resistant strain produced

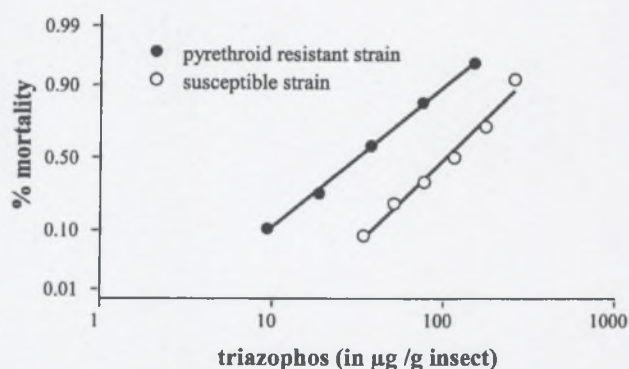


Fig. 1. Toxicity of triazophos for the *H. armigera* pyrethroid susceptible strain BK77 (●) and the pyrethroid resistant strain BK99R9 (○).

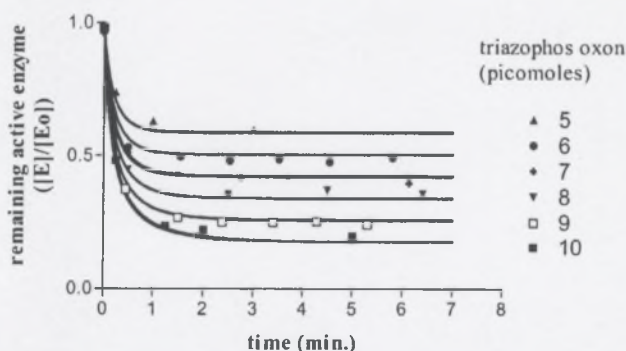


Fig. 2. Calibration of AChE solution with triazophos-oxon. 5–10 picomoles of triazophos-oxon were added to the enzyme solution and remaining activity was recorded with time.

more triazophos-oxon than the susceptible one. This was confirmed by analysis the amount of triazophos-oxon in the susceptible and resistant larvae with detectable triazophos-oxon (Fig. 3). These data suggest that the three-fold increased sensitivity to triazophos in the deltamethrin resistant strain may originate from a higher conversion of triazophos in triazophos-oxon, its active metabolite.

3. Discussion

Our results showed a significant negative cross-resistance for triazophos in pyrethroid resistant strain of *H. armigera*. Triazophos, as all phosphorothioate compounds, is not toxic. It is bioactivated inside the insect by oxidase(s) through oxidative desulfuration (the activation of P=S to P=O) to toxic oxon analogue (Kono et al., 1983). But the same oxidase(s) could also lead OP to non-toxic metabolites via the degradation of oxidative ester cleavage as shown for diazinon in the resistant house flies, the ratio of ester cleavage to desulfuration varying from oxidases (Dunkov et al., 1997; Sabourault et al., 2001). In the pyrethroid resistant strain BK99R9, a high oxidases amount was observed in a majority of larvae. Inhibition of these oxidases by piperonyl butoxide resulted to an increased efficiency of pyrethroid leading to hypothesize that the oxidase(s) inactivates pyrethroid and their overproduction leads to resistance of the insect (Martin et al., 2002a).

The method based on *in vitro* AChE inhibition to quantify triazophos-oxon in larvae was very sensitive and allowed us to estimate amounts of triazophos-oxon as low as 0.3 picomole per larvae. Our data showed higher level of triazophos-oxon in resistant larvae than in susceptible larvae which may explain the anti-resistance

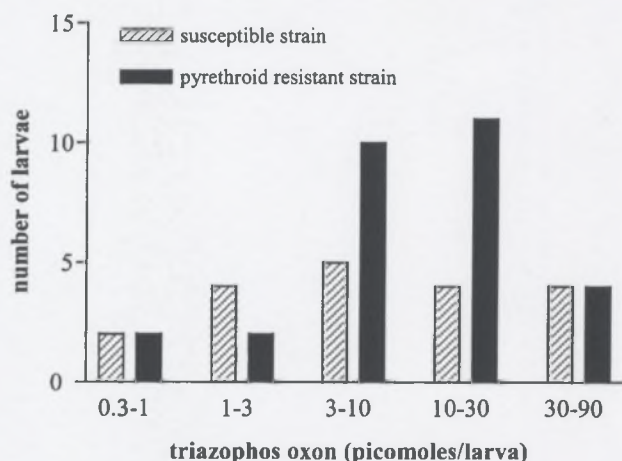


Fig. 3. Number of susceptible and pyrethroid resistant larvae found with 0.3–1, 1–3, 3–10, 10–30, 30–100 picomoles of triazophos-oxon after deposition of 840 picomoles of triazophos on the thorax corresponding to 5 µg/g insect.

property of triazophos in *H. armigera* resistant strain. The small difference in triazophos-oxon levels between larvae of susceptible and resistant strains was in agreement with the low level of antiresistance. Therefore the increase of oxidases concentration in pyrethroid resistant larvae could have, as secondary effect, the increase of triazophos oxidative metabolism producing the toxic oxon form.

There is a strong synergism between pyrethroids and triazophos: treatment of larvae with a mixture of the two insecticides gives a toxicity higher than the sum of the toxicity observed following treatment with the both insecticides alone at the same doses (Martin et al., 2003). These data strengthen the hypothesis of a competition between triazophos and pyrethroid for the same oxidase. Triazophos could occupy the active site reducing the probability of pyrethroids oxidation leading in an increased stability of pyrethroids and then a higher toxicity.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical assistance of C. Ladurantie, T. Konate, I. Ouattara and M.J. Mousso and thank Dr D. Russell (NRI), Dr R.V. Gunning (NSW Agriculture) for their corrections and comments. This research was supported by grants from Centre National de Recherche Agronomique, Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement, Université Paul Sabatier and Bayer Cropscience.

References

- Aldridge, N., 1950. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.* 46, 451–460.
- Brown, T.M., Bryson, P.K., 1992. Selective inhibitors of methyl parathion-resistant acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pest. Biochem. Physiol.* 44, 155–164.
- Charpentier, A., Menozzi, P., Marcel, V., Villatte, F., Fournier, D., 2000. A method to estimate acetylcholinesterase active sites and turnover in insects. *Anal. Biochem.* 285, 76–81.
- Dunkov, B.C., Guzov, V.M., Mocelin, G., Shotkoski, F., Brun, A., Amichot, M., Ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R., 1997. The *Drosophila* cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. *DNA Cell. Biol.* 16, 1345–1356.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Anres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Estrada-Mondaca, S., Fournier, D., 1998. Stabilization of recombinant *Drosophila* acetylcholinesterase. *Prot. Exp. Purif.* 12, 166–172.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, third ed. Cambridge University Press.
- Forrester, N.W., Cahill, M., Bird, L.J., Layland, J.K., 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa*

- armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia, in: Bull. Entomol. Res. Supplement Series N°1. International Institute of Entomology, pp. 1–132.
- Hama, H., Iwata, T., 1978. Studies of the inheritance of carbamate-resistance in the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* UHLER (Hemiptera: Cicadellidae). Relationships between insensitivity of acetylcholinesterase and cross-resistance to carbamate and organophosphate insecticides. Appl. Ent. Zool. 13, 190–202.
- Kono, Y., Sato, Y., Okada, Y., 1983. Activation of an O-ethyl S-n-propyl phosphorothiolate TIA-230 in the central nerve of spodoptera larvae. Pest. Biochem. Physiol. 20, 225–231.
- Kyomura, N., Takahashi, Y., 1979. Joint insecticidal effect of N-propyl and N-methylcarbamates on the green rice leafhopper, resistant to N-methylcarbamates. J. Pest. Sci. 4, 401–409.
- McCaffery, A.R., 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera, in: Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, pp. 1735–1750.
- Martin, T., Ochou, O.G., Hala, N.F., Vassal, J.-M., Vaissayre, M., 2000. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), in West Africa. Pest Management Sci. 56, 549–554.
- Martin, T., Chandre, F., Ochou, O.G., Vaissayre, M., Fournier, D., 2002a. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. Pest. Biochem. Physiol. 74, 17–26.
- Martin, T., Ochou, O.G., Vaissayre, M., Fournier, D., 2002b. Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa. Resistance Pest Management Newsletter 12 (1), 16–19.
- Martin, T., Ochou, O.G., Vaissayre, M., Fournier, D., 2003. Organophosphorus insecticides synergise pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. J. Econ. Entomol. 96 (2), 469–474.
- Pimprale, S.S., Besco, C.L., Bryson, P.K., Brown, T.M., 1997. Increased susceptibility of pyrethroid-resistant tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorfenapyr. J. Econ. Entomol. 90 (1), 49–54.
- Sabourault, C., Guzov, V.M., Koener, J.F., Claudianos, C., Plapp, F.W., Feyereisen, R., 2001. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (*MdaE7*) gene in resistant house flies. Insect. Mole. Biol. 10, 609–618.
- Scott, J.G., 1999. Cytochrome P450 and insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 757–777.
- Vassal, J.-M., Vaissayre, M., Martin, T., 1997. Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. Resist. Pest Manag. 9, 14–15.
- Villatte, F., Auge, D., Touton, P., Delorme, R., Fournier, D., 1999. Negative Cross-insensitivity in insecticide-resistant cotton aphid *Aphis gossypii*. Pest. Biochem. Physiol. 65, 55–61.
- Zhu, K.Y., Clark, M., 1994. Comparisons of kinetic properties of acetylcholinesterase purified from azinphosmethyl-susceptible and resistant strains of Colorado potato beetle. Pest. Biochem. Physiol. 51, 57–67.



Cotton Insect Pest Problems and Management Strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa

O.G. Ochou, T. Martin and N.F. Hala

Institut des Savanes (IDESSA) 01 BP 633 Bouaké 01, Côte d'Ivoire

ABSTRACT

The current pest management recommendations have become critical in Côte d'Ivoire. Variations in major pest profiles such as *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) and *Helicoverpa armigera* (Hübner), show that calendar treatments do not always relate to field conditions or actual pest pressure. Furthermore, since the removal of insecticide subsidies, concerns are rising regarding farmer awareness of rational pesticides use. Experimental strategies were designed to optimize farmer profits by using threshold treatments or to prevent pyrethroid resistance in bollworm by alternating insecticides in the calendar programme. Relevant strategies based on appropriate decision aids were shown to enhance the effectiveness of pest control and minimize risks of economic losses and pesticide resistance through on farm trials.

Introduction

Insect pest control is an essential yield determining factor and accordingly, pragmatic strategies have been adopted to tackle pest control problems in Côte d'Ivoire. Current recommendations include selection of tolerant varieties, cultural practices and chemical treatments for seeds and plants. Current pest control strategy have contributed to increased seed cotton yields (Vaissayre *et al.*, 1984) but pest management recommendations have become critical. Variations in major pest profiles show that calendar treatments do not always relate to field conditions or actual pest pressure. Since insecticide subsidies were removal in 1994, farmer awareness of the principles of rational pesticide use has become increasingly important.

Pyrethroids are recognized as highly effective for control of lepidopteran pests but have been widely used for twenty-five years. Recently, the threat of pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) was recognized by Vassal *et al.* (1997) who detected a relative loss in susceptibility to pyrethroid in the laboratory. In addition, the increased incidences of sucking pests such as mites *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), aphids *Aphis gossypii* (Glover) and jassids *Jacobiella fascialis* (Jacobi) have renewed interest in rational treatment strategies (Ochou, 1994). Increasing insect pest problems require improved pest management system. Experimental strategies were designed to optimize farmer profits by using threshold treatments or to prevent bollworm resistance to pyrethroids by alternating insecticides used. The utilization of control thresholds and selection of non-pyrethroid alternatives is discussed regarding current pest status and pyrethroid resistance management.

Material and Methods

Study of the spatial and temporal profiles of pest infestations. This study was conducted on farms for seven consecutive seasons (1991-1997). A total of 250 to 500 fields were chosen at random each season across the whole cotton area. Generally, 10 fields in each selected cotton zone were scouted. Fields were monitored once a week by Extension Service agents from the 30th day after emergence (d.a.e) on a sample of 30 plants per field. Plants were selected at random and examined in groups of 5 consecutive plants along a line across the diagonal of the field, avoiding the outer 10 m of the field. A total of 15 weekly observations were performed within 30 to 129 d.a.e. The upper five terminal leaves were examined for sucking pest damage and the whole plant (leaves, buds, flowers, bolls) for bollworms and leafworms. Fifty green bolls (diameter more than 20 mm) were collected and examined every week from 77 to 112 d.a.e. for endocarpic bollworm species.

Assessment of a treatment threshold programme. Field tests were carried out in 1996 on a farm scale at two locations, Boundiali and Madinani, comparing the treatment threshold programme with the current programme in a paired plot design with 15 replicates at each site. Trials comprised 2 ha homogenous plots, divided into two subplots of 1 ha each, representing the check and the experimental treatment. Cotton fields planted between May 25 and June 30 were selected. The check was the routine calendar-based programme of six fortnightly sprays of pyrethroid-organophosphate mixtures from 45. to 115 d.a.e. The experimental programme used thresholds at the vegetative stage. From 30 to 60 d.a.e., treatments were applied immediately against mites, any major leaf pests or bollworms when specific thresholds

were reached (Table 1). The routine fortnightly spray programme was applied from 72 to 115 d.a.e. Individual plots were scouted once a week from 38 to 66 d.a.e.. Pegboards (Ochou, 1994) were provided for scouting. Trials were assessed on the percent green bolls attacked and the seed cotton yield. Fifty green bolls were collected and examined weekly from 83 to 118 d.a.e. Yields were estimated by harvesting 10 m of the 10 middle rows from each farm.

Assessment of a non-pyrethroid alternative programme. Farm scale trials were conducted in 1997 with 10 replicates at each of two locations, M'Bengué and Tengréla, in a paired plot design. Individual homogenous $\frac{1}{2}$ ha plots were divided into two subplots of $\frac{1}{4}$ ha each, representing the check and the experimental programme. Cotton fields planted between June 2 and 10 were selected. The check programme was the routine calendar-based schedule of six fortnightly applications. The experimental programme was the bollworm resistance management plan that divided the *H. armigera* damage season into the vegetative stage (30-60 d.a.e.) and the fruiting stage (60-122 d.a.e.). Endosulfan was selected as the alternate insecticide for use during the early season with application dates on 45 and 59 d.a.e. Pyrethroids associated with organophosphate insecticides were used only during the fruiting stage (Table 2). Trials were assessed by sampling for bollworm presence on plants and damage on green bolls. Individual plots were scouted once a week, starting on the 30th d.a.e. Further observations were performed by analyzing mature bolls that were picked from one central row and examined by counting the number of boll with lint damage. Seed cotton yield was estimated by harvesting 10 m. of the 10 middle rows of each plot.

Results

Current major pest problems. Data from the last seven years established the status of major pests that occur frequently on most farms when high infestations represent high risk. Their geographic and seasonal profiles are described with regard to different sowing dates and cotton plant phenology.

Overall data indicate that aphids and jassids are key pests in the sucking pest complex early in the season. They are followed by mites in the vegetative stage. Mites are well established all over the cotton zones, except the northern zone where infestations were shown to be rare. Its infestations appeared any time earlier than 30 d.a.e. and increased quickly to reach a maximum, mostly between 65 and 93 d.a.e. The distribution of peaks ranged from mid-August to late October. Mite infestations appeared usually in July-August as rainfall in July is not extreme and sunshine decreases considerably in August. As early as

1972, aphid became widespread as referred to in annual research reports of the entomology division and increased in importance after the introduction of pyrethroids and ULV application techniques. Infestations are distributed over three quarters of the cotton area with higher infestations south of the 9th parallel. Aphids appeared approximately three weeks after cotton emergence, rose to a maximum as late as 72 d.a.e. for cotton sown in May or as early as 30 d.a.e. for cotton sown in late July and decreased quickly after August. Jassids occurred with relatively high levels confined to the eastern and upper central parts of the cotton area. Infestations were noticed at 23 to 37 d.a.e. and decreased quickly from 44 d.a.e., indicating the effectiveness of spray applications, starting at about 45 d.a.e. Early sown cotton was more heavily infested than late sown cotton.

Major bollworm pests included an exocarpic species, *H. armigera* and two endocarpic species *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) and *Pectinophora gossypiella* (Saunders). The bollworm *H. armigera* was the most destructive and regularly represented high risk for late sown cotton. In contrast to its earlier distribution, confined mainly below the 9th parallel (Angélini, 1970), *H. armigera* occurred in the northern zones. Larvae were noticed usually within 44 to 51 d.a.e. before flowering, provided buds were initiated. Infestation peaks were generally reached from mid-September to late October. Early sown cotton (June) was less infested than late sown cotton. False-codling moth *C. leucotreta* appeared as the most significant bollworm pest of cotton in Côte d'Ivoire. It was found over the whole cotton area, but higher infestations occurred mainly in the southern and north-eastern zones. Infestations occurred as soon as flower buds were formed. The larval populations appeared on buds at 55 d.a.e., then increased with flowering to reach a peak at 90 d.a.e. The level of infestations was maintained up to harvest. Cotton sown at different times had the same chance of being infested by *C. leucotreta*. The pink bollworm *P. gossypiella*, had roughly the same geographic distribution as *C. leucotreta*. *P. gossypiella* infested cotton buds as early as *C. leucotreta*, but the first generation disappeared after one week. Its occurrence was frequently noticed on flowers and bolls after *C. leucotreta* from 93 to 100 d.a.e. when infestations reached a maximum and persisted up to harvest. In most zones where *P. gossypiella* was predominant, infestations tended to be higher as sowing dates progressed through June, then decreased in early to mid-July and increased again by late July.

Although considered occasional pests, some insects deserve attention because of their previous serious pest status. Whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) occurred sporadically in 1985-1986 in the northern

zones but since then, no significant damage has been reported. Spiny bollworms *Earias insulana* (Boisduval) and *E. biplaga* (Walker) were observed regularly in most cotton zones, but infestations were dominant in the southern zones. *Earias* sp. behave either as borers penetrating tips of young cotton plants or as bollworms feeding on buds, flowers and green bolls. Red bollworm, *Diparopsis watersi* (Roths.), has regressed and illustrates the importance of the closed cotton season. Leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval) infestations were generally very low. Leaf roller, *Syllepte derogata* (Fabricius) was found regularly at low levels, although relatively high infestations occurred sporadically in several areas. This pest seems to be controlled by insecticides so its occurrence was often regarded as a symptom of poorly treated fields. Up to 1980, semi-looper *Anomis flava* (Fabricius) was considered a serious pest with infestations in all cotton zones but its status has decreased drastically due to better chemical control. Cotton stainer *Dysdercus voelkeri* (Schmidt) is a late season pest at low infestation rates in most zones.

Treatment threshold programme. The number of spray applications in the experimental fields averaged 4.8 and 5.8 while the check programme averaged 5.8 and 6.0 at the two test sites, respectively (Table 3). Sprays determined by thresholds were needed in most fields, targeting mostly aphids, jassids, and leaf rollers. Aphids sprays comprised 96% of treatment (27 out of 28) at Madinani and 50% at Boundiali. Bollworm numbers did not exceed thresholds so no sprays were applied. Overall data on green boll damage and seed cotton yield showed a significant difference between the experimental and routine programmes. A significant yield increase (105-117 %) was recorded for the experimental plots.

Non-pyrethroid alternate programme. Bollworm populations were relatively low throughout the season at the two test sites. *H. armigera* was still present at the flowering stage in Tengréla, but data did not show a significant difference between the check and the experimental programmes. Apart from the green boll damage recorded at one site (M'Bengué) the percentage of healthy mature bolls and seed cotton yields did not differ significantly (Table 4). Overall, the new control programme using two sprays of endosulfan at the vegetative stage appeared to be equivalent to routine spraying in biological efficacy in controlling bollworm and in ensuring satisfactory seed cotton yields. This programme, using alternate insecticides to limit sprays of pyrethroids, proved helpful in preventing resistance to pyrethroids.

Discussion

The main picture to come out of this study was the greater awareness of the ecological variability in

pest distribution, pest occurrence and pest infestation levels. Climatic factors such as rainfall, intensity of sunshine and temperature effect of the monsoon dry wind (Angélini, 1970; Duviard, 1971) and cultural practices, such as sowing date, cotton variety and refuge host plants appeared to explain pest profiles. The amount and distribution of rainfall, determined by the latitude and longitude, appeared to be the predominant factor, influencing cultural practices of a given region. Rainfall distribution in a single rainy season and two rainy seasons respectively above and below the 9th parallel affect the early infestations of aphids, jassids and *H. armigera*.

Sufficient elements are highlighted by these results to show the importance of timing spray applications. Data indicated that major pest infestation levels can be used effectively as an indicator for spray timing. The strategy of control thresholds at the vegetative stage allowed delayed use of pyrethroids. The overall positive data obtained and cost-effectiveness of the threshold programme supported the rational use of insecticides. The adoption of this strategy by farmers will represent an opportunity to improve their performance in managing cotton insect pests. With regard to the semi-illiterate status of most cotton farmers in Côte d'Ivoire (Ochou *et al.*, 1998), there is a clear need to educate them through appropriate rural schools in various relevant aspects (beneficial and insect pests, products and their application, etc.). Farmers need appropriate field diagnostic tools and techniques for monitoring, along with other facilities. The use of educational material illustrated with simple texts and colour photographs of pests and their damage will aid individual decision-making.

By using alternate insecticides at the vegetative stage and limiting pyrethroid use to the fruiting period, sufficient control of exocarpic bollworms and sucking pests was reached. The goal is to delay the onset of pyrethroid resistance in *H. armigera* until late in the season. Pyrethroid based mixtures were kept to the fruiting stage, based on endocarpic bollworm activity. The endocarpic regime makes scouting difficult as farmers may be reluctant to collect green bolls for monitoring. Endosulfan is an organochlorine used in pyrethroid resistance management in Australia (Sawicki and Denholm, 1987). Many other insecticides are available in the pyrethroid resistance prevention plan (Bagwell *et al.*, 1989). Their effectiveness is being assessed in additional tests.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support and chemical supplies provided by AgrEvo, Novartis, Hydrochem, ALM, STEPAC, Callivoire, Rhône Poulenc.

References

- Angélini, A. (1970): La protection phytosanitaire des cultures de cotonnier en Côte d'Ivoire. In: Développement de la culture cotonnière en Côte d'Ivoire, Tome 2, Les bases scientifiques et techniques. MINAGRI, Abidjan.
- Bagwell, R.D., F.W. Plapp Jr. and S.J. Nemec. (1989): Field evaluation of management plans, using alternate insecticides, for pyrethroid resistant tobacco budworm. In: Proc. Beltwide Cot. Conf. J. Brown (Ed). NCC, Memphis, TN. Pp 359-364.
- Duviard. (1971): L'Harmattan et ses conséquences écologiques pour l'entomofaune du champ de coton en Côte d'Ivoire centrale. ORSTOM Adiopodoumé-IRCT Bouaké, 6 Pp.
- Ochou, O.G. (1994): Decision making for cotton insect pest management in Côte d'Ivoire. PhD Thesis, Imperial College, London. 306 Pp.
- Ochou, O.G., G.A. Matthews, J.D. Mumford. (1998): Farmers' knowledge and perception of cotton insect pest problems in Côte d'Ivoire. International J. Pest Management 44(1):5-9.
- Sawiki, R.M. and I. Denholm. (1987): Management of resistance to pesticides in cotton pests. Tropical Pest Management 33 (4):262-272.
- Vaissayre, M., G. Sement and J.P. Trijau. (1984): Aspects phytosanitaires de la culture cotonnière en Côte d'Ivoire, d'après le réseau d'essais à trois niveaux de protection. Cot. Fib. Trop., 39(2):1-7.
- Vassal, J.M., T. Martin, N.F. Hala, O.G. Ochou and M. Vaissayre. (1997): Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. Poster, Resistance Conference of Rothamstead, 1997.

Table 1. Action thresholds for major pests and insecticides used.

Insect pests	Action thresholds	Specific insecticides used (g/ha)
Mite <i>Polyphagotarsonemus latus</i>	2 spots/6 groups of 5 plants	profénofos 300 g/ha triazophos 250 g/ha
Aphid <i>Aphis gossypii</i>	10 infested plants / 30 plants	profenofos 400 g/ha dimethoate 400 g/ha
Jassid <i>Jacobiella fascialis</i>	5 plants attacked / 30 plants	profenofos 300 g/ha
Leaf worms	5 plants attacked / 30 plants	profenofos 300 g/ha
Bollworm complex	3 larvae	endosulfan 700g/ha cypermethrin+profenofos 36-300 deltamethrin+triazophos 12-250

Table 2. Treatments and insecticides used in the experimental and routine programmes.

Locations	Schemes	Vegetative stage (45-60 d.a.e.)	Fruiting stage (60-115 d.a.e.)
		Treatments T1 and T2	Treatments T3, T4, T5 and T6
M'Bengué	Innovation	endosulfan 750 g/ha	cypermethrin-profenofos 36-150
	Check	cypermethrin-profenofos 36-150	cypermethrin-profenofos 36-150
Tengréla	Innovation	endosulfan 750 g/ha	cypermethrin-profenofos 36-150
	Check	cypermethrin-profenofos 36-150	T3 and T4: cyperm.-profenofos 36-150 T5 and T6: cyperm.-dimethoate 36-300

Table 3. Average number of sprays, efficacy and s/c yield of threshold and routine spray programmes.

Programmes	Site 1: Boundiali			Site 2: Madinani		
	numb. treat.	% attack boll	yield (kg/ha)	numb. treat.	% attack boll	yield (kg/ha)
Check	5.8M	10.88	1354.6 b	6.0 M	7.73	1519.6
Experimental	3.9M+0.9OP	10.24	1420.4 a	4.0M+1.8OP	6.29	1691.0
F			13.87			3.39
CV			3.5%			15.9%
Prob.			0.000			0.084
Signif(p<.05)			hs			ns

M: Pyrethroid + organophosphate mixture treatments; OP: Organophosphate insecticide treatments

Table 4. Percent healthy green bolls and mature bolls and seed cotton yield in field tests at two locations.

	Site 1: M'Bengué			Site 2: Tengréla		
	Green bolls	Mature bolls	Yield (kg/ha)	Green bolls	Mature bolls	Yield (kg/ha)
Check	82 b	77	1698	89	91	1978
Innovation	87 a	80	1737	90	92	2331
F	8.59	1.49	0.04	1.14	1.53	3.32
CV	4.7%	6.5%	26.8%	2.4%	1.9%	18.0%
S.D. (p<0.05)	s	ns	ns	ns	ns	ns

- El-Badawy, F.A., A.R. Frag, L.A. Halawa, A.A.Korkor and A.A. Hariry. 1980. The ovicidal activity of certain insecticides against egg-masses of *Spodoptera littoralis* (Boisd) in Gmmeiza Experimental Farm. Proc. 1st conf. Pl.Prot.Res. Ins. Cairo, 1: 89-99.
- El-Barmawy, Z. A., A.A. El-Shiekh, M.H.Rashwan and H.S.A. Radwan. 1991-92. Pyrethroids resistance in *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera:Noctuidae) in lower Egypt. Bull. Ent. Soc. Egypt Econ. Ser. 19 :41-51
- El-dahan, A. A., M. A. El-guindy and N. M. Bakry. 1985. Efficacy of certain insecticides against a field strain of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd) during 1980 season . Bull. Ent. Soc. Egypte, Econ. Ser. (13): 1-7.
- El-said, E. I. and E. A. Sammour. 1991. Insecticide resistance in the field population of the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (boisd) Bull. Ent. Soc. Egypte, Econ. Ser. (17) : 77-83.
- El-sebae, A. H., M. Abo-zeid, and M. A. Salach. 1993. Status and environmental impact of toxaphene in the third world- a case of African Agriculture. Chemosphere. 27 (10) 2063-2072
- Peterson, L. G., J. R. Ruberson, R. K. Sprengel, J. R. Weeks, M. C. Donahoe, R. H. Smith, J. S. Swart, D. J. Reid, and G. D. Thompson. 1997. Tracer naturally insect control and IBM. Down to Earth. 52(1): 28-34.
- Radwan, H.S.A., I.M.A.Ammar, A.A.K.Eisa, A.E.E.El-Sheikh, Z.A.El-Bermawi and A.I.Farag. 1985. Initial and latent bioactivity of five insect growth regulators on the development and reproduction of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd). Proc. 6th. Arab Pesticide Conf. Tanta Univ. vol (1): 139-151.
- Rashwan, M H., X.A. El-Barmawy, A.A.El-Shiekh and H.S.A.Radwan. 1991-92. The onset of organophosphates and carbamates resistance among Lower Egypt population of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd). Bull. Ent. Soc. Egypt Econ. Ser. 19: 211-220.
- Salgado, V. L. 1997. The mode of action of spinosad and other insect control products. Down To Earth. 52 (1): 35-43.
- Sawicki, R. M. and I. Denholm. 1987. Management of resistance to pesticides in cotton pests . Tropical pest management, 33 (4): 262-272.
- Thompson,G.D., K.H. Michel, R.C. Yao, J.S.Mynderse, C.T. Mosburg, T.V.Worden, E.H.Chio, T.C.Sparks, and S.H.Hutchins. 1997. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products. .Down to Earth. 52 (1) :1-5.
- Yehia H. I., M. E. Keddis, F. A. Ayad , M. M. Abdel-sattar and M. A. El-guindy. 1985a. Survey of resistance to organophosphorous insecticides in the field strains of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (boisd) during 1980-1984 cotton growing seasons. Bull. ent. Soc. Egypt, Econ. Ser., 14: 399-404.
- Yehia, H. I., M. E. Keddis, M. A. Abdel-sattar, F. A. Ayad, and M. A. El-guindy. 1985b. Survey of resistance to pyrethroids in field strains of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd) during 1980-1984 cotton growing seasons. Bull. Ent. Soc. Egypt, Ser., 14: 405-411.

S. A. Temerak

Head of Biocontrol Unit
Research Entomologist
College of Agriculture
Assiut University
Egypt

Tel: 202 3884710

Fax: 202 3875539

Mobile: 2010 1101363

E-mail stemerak@hotmail.com

Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner): Recent Developments and Prospects for its Management in Côte d'Ivoire, West Africa

ABSTRACT The susceptibility to pyrethroids in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) from Côte d'Ivoire, West Africa, decreased steadily for years to such an extent that field infestations became critical and culminated in 1998. Accordingly, a relevant resistance management strategy was developed. Innovative programmes were implemented with several non-pyrethroid insecticides to control the first generation of *H. armigera* at the cotton vegetative stage, as pyrethroid insecticide sprays were restricted to the cotton fruiting stage. Three-year data showed that pyrethroid resistance management programmes based on endosulfan or profenofos sprays at the cotton vegetative stage were effective in controlling *H. armigera* infestations and ensured satisfactory seed cotton yields. Similar programmes performed with new insecticides (spinosad, indoxacarb) appeared to be at least equivalent to endosulfan or profenofos based programs. The wide adoption of the insect resistance management strategy at the national level contributed to significantly reduced field populations of *H. armigera* for the last two years and helped stabilize the resistance level.

KEY WORDS Cotton, *Helicoverpa armigera*, pyrethroid resistance management programs, non-pyrethroid alternates, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION Early pest control strategies adopted in Côte d'Ivoire have contributed to increased seed cotton yields (Vaissayre et al., 1984). Pest management recommendations, while including selections of tolerant varieties and cultural practices, rely heavily on chemical treatments for seeds and plants. Accordingly, arthropod pest management is currently achieved through the use of pyrethroid-organophosphate insecticide mixtures in order to control the whole cotton pest complex. On one hand, organophosphate insecticides are used either at normal dosage rates against sucking pests such as the yellow mite *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius), and the aphid *Aphis gossypii* (Glover), or at reduced dosage rates against some leaf pests such as the Egyptian leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval), and the Leaf roller, *Syllepte derogata* (Fabricius). On the other hand, pyrethroids target the bollworm complex, exocarpic species (*Helicoverpa armigera* (Hübner), *Earias insulana* (Boisduval), and *Diparopsis watersi* (Rotchilts)) as well as endocarpic species

(*Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick) and *Pectinophora gossypiella* (Saunders)).

Known as very effective in controlling most cotton bollworm pests, pyrethroids have been widely used for more than twenty years in Côte d'Ivoire. Recently (since 1994), during exceptional pest outbreaks, farmers have complained about several supplied insecticides. Moreover, cases of ineffectiveness of the pest control programme against *H. armigera* have been reported in Côte d'Ivoire (Ochou, 1994; Ochou et al., 1998). At the same time, most countries in West Africa (Benin, Burkina Faso, Guinea, Mali, Senegal, and Togo) experienced serious similar problems (Anonymous, 1999). With this regard, the routine calendar-based programme of applying six fortnightly sprays of pyrethroid-organophosphate insecticide mixtures over the whole cotton season (from 45th to 115th DAE -Day After Emergence of cotton) has been questioned as a critical decrease in the pyrethroid susceptibility in *H. armigera* was noticed in 1995 by Vassal et al. (1997), in the routine laboratory monitoring of LD50 at Bouaké, Côte d'Ivoire.

The pyrethroid resistance in *H. armigera* was confirmed in 1996 by Martin et al. (2000) and (Ochou et al., 1998). Similar cases of resistance were reported in *H. armigera* in Australia (Gunning et al., 1984), Thailand (Collins, 1986), India (McCaffery et al., 1989), Turkey (Riley, 1990), Indonesia (McCaffery and Walker, 1991), China (Shen et al., 1992), and India (Armes et al., 1994). Inspired by the "Australian" strategy (Sawicki and Denholm, 1987), an insect resistance management (IRM) strategy was designed in Côte d'Ivoire. Accordingly, earlier recommendations were amended and innovative pyrethroid resistance

management programmes have been implemented, developed, and adopted nationwide by cotton farmers since 1998.

The local IRM strategy aimed at preventing and managing mainly the pyrethroid resistance in *H. armigera* by lessening pyrethroid selection pressure by restricting their use while using non-pyrethroid alternates in a kind of "window" programme. The insect resistance management (IRM) plan divides the *H. armigera* damage season into the vegetative stage (30-66 DAE) and the fruiting stage (73-115 DAE) as only two generations of *H. armigera* are known to occur through the cotton season. From the early stage up to early flowering of cotton plants, the innovative strategy advises sprays of selected non-pyrethroid insecticides (Table 1) for the control of both *H. armigera* and other key pests such as mites. During the second stage, a period that coincides with maximum flowering and the largest numbers of the most damaging endocarpic bollworm species (*C. leucotreta* and *P. gossypiella*) and exocarpic bollworms (*H. armigera* and *D. watersi*), the strategy recommends maintaining pyrethroid-organophosphate spray mixtures.

The present paper addresses the historical profile in the development of *H. armigera* resistance to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire and the actual impact of the three year nationwide implementation of the insect resistance management (IRM) strategy with respect to actual field infestation profiles, evolutions of earlier pyrethroid resistance levels, and the effectiveness of new alternate non pyrethroid insecticides.

Table 1: Pest control schemes recommended with regard to restriction on the use of pyrethroids and to major pests distribution within cotton areas of Côte d'Ivoire.

COTTON AREAS		VEGETATIVE STAGE 45-73 DAE	FRUITING STAGE	
			73-101 DAE	101-122 DAE
ZONE 1-1 Extreme North	Major pests	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , Leafworms	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , <i>Diparopsis</i> , <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , Leafworms	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , <i>D. watersi</i> , <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>E. tabaci</i>
	Number of sprays	2	2	2
	Insecticides	Endosulfan 700, profenofos 750, Spinosad 48 Indoxacarb 25, Thiodicarb 750 g/ha	Pyrethroids+OPs (leafworms) Pyrethroids + non OPs (leafworms)	Pyrethroids + Aleurodicides
	Pyrethroid use restriction	Use only Non Pyrethroids	Use Pyrethroids only after August 10 th	
ZONE 1-2 North	Major pests	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , <i>P. gossypiella</i> , Mites, Leafworms	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>D. watersi</i> , Leafworms, Mites	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>D. watersi</i> , Leafworms
	Number of sprays	2	2	2
	Insecticides	Endosulfan 700, profenofos 750, Spinosad 48 Indoxacarb 25, Thiodicarb 750 g/ha	Pyrethroids + OPs (leafworms) Pyrethroids + non OPs (leafworms)	Pyrethroids + OPs (leafworms) Pyrethroids + non OPs (leafworms)
	Pyrethroid use restriction	Use only Non Pyrethroids	Use Pyrethroids only after August 10 th	
ZONE 2 South	Major pests	<i>H. armigera</i> , <i>Earias</i> , <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , Mites, Leafworms	<i>H. armigera</i> , <i>E. insulana</i> , Leafworms <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , Mites	<i>H. armigera</i> , <i>E. insulana</i> , Leafworms <i>C. leucotreta</i> , <i>P. gossypiella</i> , Mites
	Number of sprays	2	2	2
	Insecticides	Endosulfan 700, profenofos 750, Spinosad 48 Indoxacarb 25, Thiodicarb 750 g/ha	Pyrethroids + OPs acaricides Pyrethroids + non OPs acaricides	Pyrethroids + OPs (leafworms) Pyrethroids + non OPs (leafworms)
	Pyrethroid use restriction	Use only Non Pyrethroids	Use Pyrethroids only after August 20 th	
Pyrethroids: It is advised to diversify active ingredients of pyrethroid family. Their use is restricted to after August 10 and 20 respectively for the northern and southern areas				
Non Pyrethroids: It is advised to associate some non pyrethroids with OPs (especially spinosad 48 g/ha, indoxacarb 25 g/ha) in order to control the whole pest complex				
OPs acaricides: Targeted against mites mainly, most used OPs are triazophos 250 g/ha, profenofos 300 g/ha, chlorpyrifos ethyl 300 g/ha. They are used in mixture with Pyrethroids.				
OPs (leafworms): Targeted against leafworms, most used OPs are triazophos 150 g/ha, profenofos 150 g/ha, chlorpyrifos ethyl 150 g/ha. They are used in mixture with Pyrethroids.				
Non OPs acaricides: It is advised to use for the fruiting stage Non OPs acaricides after the use of profenofos 750 at vegetative stage, in order to limit the selection pressure on mites; selected Non OPs acaricides are diafenthiuron 300 g/ha, pyrimidiphen 50 g/ha, pyridaben 150 g/ha.				
Aleurodicides: Targeted against <i>Bemisia tabaci</i> in the extreme north, dimethoate 300 g/ha, acetamiprid 10 g/ha or benflurecarb 250 g/ha are used in mixture with Pyrethroids.				

MATERIALS and METHODS

Laboratory monitoring of LD50:

The susceptibility of *H. armigera* to pyrethroids has been monitored in Côte d'Ivoire since 1985. A topical application method was performed on different strains collected and reared in the entomological laboratory of the cotton research station based at Bouaké (Martin et al., 2000). The reference strain was collected in 1977. This strain, which has never been exposed to pyrethroids, is being reared in the CIRAD Montpellier laboratory. LD50 (in $\mu\text{g ai/g larva}$) values were determined for two active ingredients: cypermethrin and deltamethrin. Statistical analyses of data were performed with the log-probit method (Finney, 1971).

Monitoring of field population dynamics:

Field infestation levels of *H. armigera* have been monitored since 1991 in Côte d'Ivoire through a multilocal network involving 250-500 cotton farms chosen at random in groups of 10 fields in every cotton zone across the whole cotton area. Fields were scouted once a week by extension service agents from 30th to 122nd DAE (Day After Emergence of cotton) on a sample of 30 plants per field. Plants were selected at random and examined in groups of 5 consecutive plants along a line across the diagonal of the field, avoiding the outer 10 m of the field. The whole plant (leaves, buds, flowers, bolls) was scouted for the *H. armigera*. Annual variations of field infestation levels were determined as well as their seasonal and spatial profiles.

Implementation of insect resistance management (IRM) programmes:

First of all, IRM programmes were implemented in 1997-1998 with two non-pyrethroid insecticides (endosulfan 750-700g/ha and profenofos 750 g/ha). Field assessment of innovative programmes was performed at several sites in a paired plot design with 10 replicates each. Individual homogenous $\frac{1}{2}$ ha plots were divided into two subplots of $\frac{1}{4}$ ha each, representing the control and the experimental programme. Cotton fields planted between June 2nd and 10th were selected. Innovative programmes were assessed with regard to bollworm pest control effectiveness and to seed cotton yields as compared to the control.

Subsequently, the IRM programmes were adopted first in the northern part of the country in 1998 and then nationwide since 1999. In practice, the adoption of the IRM programmes led to the determination of a pyrethroid-free season nationwide. The pyrethroid-free season is established by calendar dates that are related

to optimal cotton sowing dates with regard to determined cotton growing zones. Deadlines are set to August 10 and August 20 respectively for northern and southern regions.

Assessment of new alternate non-pyrethroid insecticides:

New alternate non-pyrethroid insecticides were investigated in order to replace eventually endosulfan and profenofos, which for many reasons were being questioned (high toxicity, resistance risks, etc.). Accordingly, studies were undertaken in 1999-2000 to compare biological efficiency of eight (8) insecticides: endosulfan 750 g/ha (Phaser 375 EC, AgrEvo), profenofos 750 g/ha (Curacron 500 EC, Novartis), spinosad 48g/ha (Laser 480SC, Dow AgroScience), indoxacarb 25g/ha (Avaunt 150 SC, Dupont), isoxathion 600 g/ha (Karphos 600 EC, Calliope), thiodicarb 750 g/ha (Larvin 375 EC, Rhône Poulenc), chlorpyrifos éthyl 720 g/ha (Dursban 480 EC, Dow AgroScience), and deltamethrin 12 g/ha (Decis 12 EC, AgrEvo) used here as reference.

Insecticides were assessed within a Complete Bloc Design with six replicates. Individual plots were of 10 rows x 12 meters. Sprays were performed with an adapted horizontal boom knapsack sprayer debiting 60 l/ha of product-water mixture. Plots were treated every 14 days with the same insecticide from 45th to 115th DAE. Sucking pests (*A. gossypii*, *J. fascialis*, *D. voelkeri*) and bollworms pests (*C. leucotreta*, *P. gossypiella*, *H. armigera*, *E. Insulana*) and *S. littoralis* were scouted directly on plants or on shed organs and green bolls.

RESULTS

The development of resistance in *H. armigera*:

Laboratory data obtained within 1996-1998 showed a significant increase in the LD50 for both cypermethrin (Figure 1) and deltamethrin (Figure 2). A clear tendency for pyrethroids resistance to develop in *H. armigera* appeared. Calculated resistance factors were about 10 and 20 for cypermethrin and deltamethrin respectively. This situation suggested that the bollworm populations subjected to successive tests were becoming heterogeneous with an important fraction of *H. armigera* populations escaping the effect of pyrethroids.

Field data recorded for eight consecutive years pointed out that the pest infestation profiles changed deeply from 1991 to 1998. Two main phases were distinguished in the pest annual, seasonal, and geographic variation patterns (Figures 3, 4 & 5).

In 1991-1994, variations in the pattern showed that average annual infestation levels remained low and fluctuated within 0.08-0.27 larvae/30 plants (Figure 3).

Within this phase (1991-1994), larval populations generally appeared not earlier than July 15th, depending mainly on cotton phenological stage and usually at flowering within 44-51 DAE. Larval infestations remained low until early October, and infestation peaks occurred within the period of mid-October and mid-November. Infestation levels depended on the period in which cotton was sown (Figure 4). There was a clear tendency that showed that late-sown cottons (July-August) were more infested than early-sown cottons (May-June). The geographic distribution of infestations showed that heavy infestations were confined to a few localities in the western part of the cotton area (Figure 5).

In 1995-1998, during the second phase, a totally different pattern was observed in the pest infestation profiles. Average annual infestation levels were higher than during the first phase, and increased from 0.23 to 0.87 larvae/30 plants. The most critical infestation level was recorded in 1998. Larval populations appeared at high levels earlier than before, within July 21st - August 11th. Then, their occurrence increased quickly to reach several peaks in different periods: mid August, early September and early October. The tendency that only late sown cottons were heavily infested was no longer available. Important infestations were noticed on early-sown cottons as well as on late-sown cottons. In contrast to its earlier geographic distribution, *H. armigera* infestation outbreaks occurred in almost all of the cotton area.

Effectiveness of IRM programmes:

Data presented in Table 2 indicated that innovative programmes based on endosulfan 750 g/ha appeared to be at least equivalent to routine-based programmes. Endosulfan sprays at the cotton vegetative growing stage were more effective in controlling *H. armigera* infestations and ensured satisfactory seed cotton yields. The innovative programme performed with profenofos did not show a significant difference as *H. armigera* infestations were relatively low throughout most test sites. However, overall data showed satisfactory results

in controlling endocarpic bollworm complex and in ensuring satisfactory seed cotton yields.

Impact of nationwide adoption of the IRM strategy on field infestations of *H. armigera*:

The main picture that came out of the nationwide adoption of the insect resistance management strategy is the important decrease in the field populations of the *H. armigera* over the last two years. Sufficient elements highlighted by data described below revealed the impact of the IRM programmes.

Annual variations for the last two years (1999 and 2000) pointed out an important regression of *H. armigera* field infestation levels (Figure 3). The average annual infestation levels dropped significantly from 0.87 larvae p. 30 plants in 1998 to 0.02 larvae p. 30 plants in 1999 and 0.10 larvae p. 30 plants in 2000. Over the last two years, a new pattern emerged in the pest seasonal infestation profile (Figure 4). Indeed, field data showed that infestations were rare and remained very low throughout the whole cotton-growing season. The pest outbreaks noticed in overall cotton areas in years 1995-1998, particularly in 1998 when several localities experienced the highest levels of infestations ever reached, dropped significantly between 1999-2000 and important distribution limited to only a very few localities (Figure 5).

Impact of nationwide adoption of the IRM strategy on the evolution of *H. armigera* resistance levels:

H. armigera infestations were relatively low throughout the last two seasons in most test sites and it was very hard finding larvae to perform laboratory tests. Topical application tests were performed on strains collected at different periods of the year, on various crops, and in various cotton areas in 1999 and 2000 (Table 3). LD50 values were more or less equal to values recorded since 1996 for deltamethrin. High deltamethrin resistant levels were obtained for strains collected on cotton in October. It appeared clearly that LD50 levels obtained for cypermethrin (Figure 1) and deltamethrin (Figure 2) did not increase significantly from 1998 but remained constant at the same levels or decreased in 2000.

Effectiveness of newly alternate non-pyrethroid insecticides:

Data presented in Table 4 showed that new insecticides such as spinosad (48g/ha) and indoxacarb (25 g/ha) were at least equivalent to deltamethrin in effectiveness against

Table 2: Comparison of the effectiveness of non-pyrethroids based programmes with regard to *H. armigera* (average number of larvae/30 plants), endocarpic bollworms (average number of larvae p. 100 green bolls) and seed cotton yield (kg/ha).

Comparative programmes	Participants	<i>H. armigera</i> T1-T2	<i>H. armigera</i> T1-T6	Endocarpic bollworms	Seed cotton yield
Check (Pyrethroids-OPs)	45	1.13 b	3.71 b	1.5	1209 b
Endosulfan 750 g/ha		0.27 a	1.51 a	1.1	1402 a
Check (Pyrethroids-OPs)	30	0	0.73	1.30 b	2340
Profenafos 750 g/ha		0.03	1.23	0.80 a	2343
T1-T2: average data over the vegetative stage of cotton, comprising two applications of defined insecticides					
T1-T6: average data over the vegetative and fruiting stages of cotton.					

most main pest components, with respect to *A. gossypii* (number of infested plants on 3 rows), *D. voelkeri* (average number of the insect p. 30 plants), *S. littoralis* (average number of larvae p. 30 plants), *H. armigera* (average number of larvae/30 plants), *E. insulana* (average number of larvae p. 30 plants), endocarpic bollworms (average number of larvae p. 100 green bolls), and the percent bored organs in the shedding.

DISCUSSION The performance of the IRM strategy explains indeed the reason of its wide adoption by farmers. By using alternate insecticides at the vegetative stage and by limiting pyrethroid use to the

fruiting period, sufficient control of exocarpic bollworms and sucking pests was achieved. The present study pointed out the strengths and weaknesses of non-pyrethroids insecticides. Results showed differential activities with respect to insect species. Some insecticides may need to be reinforced by other insecticides in such a way to control the whole arthropod pest complex. The spectrum activity of proposed alternate pyrethroid insecticides should be considered in order to justify their positioning with regard to cotton crop phenology and seasonal development of main pest species.

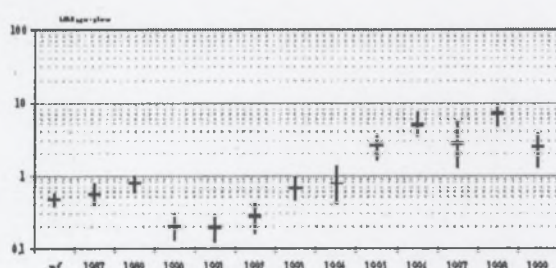


Figure 1: LD50 survey of cypermethrin from 1987 to 1999 with topical application tests on *Helicoverpa armigera* Bouaké strain.

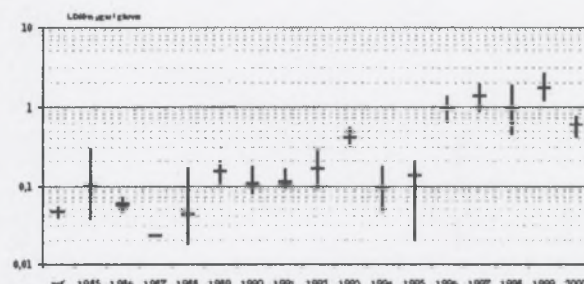


Figure 2: LD50 survey of deltamethrin from 1985 to 1998 with topical application tests on *Helicoverpa armigera* Bouaké strain.

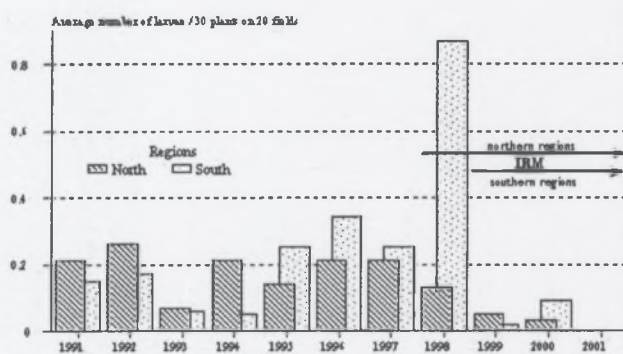


Figure 3: Annual variations of average field infestation levels of *H. armigera* in cotton areas of Côte d'Ivoire before and after IRM.

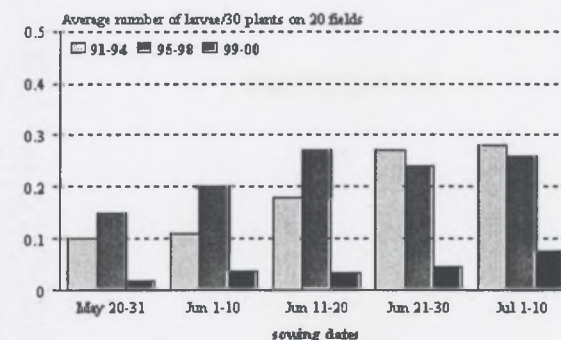


Figure 4: Comparison of average infestation levels of *H. armigera* according to sowing decades in northern cotton zones.

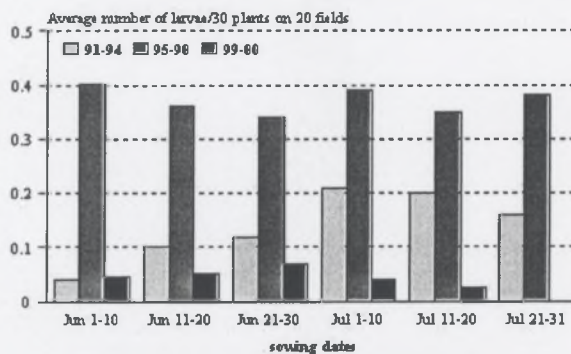


Figure 5: Comparison of average infestation levels of *H. armigera* according to sowing decades in southern cotton zones.

Endosulfan is used in pyrethroid resistance management in Australia despite its resistance level in *H. armigera* (Sawicki and Denholm, 1987, Gunning and Easton, 1994). Actually no resistance to endosulfan, as for other pyrethroids alternatives, has been detected in Côte d'Ivoire. However, its recommendation is being questioned with regard to its toxicity. Some work is being done (Ochou & Martin, 2000) to revise the dosage in order to adapt relatively low doses of endosulfan or profenofos to the actual *H. armigera* infestation pressure in the fields. Future recommendations based on research data indicate effective minimal dosages at 525 g/ha and 500 g/ha for endosulfan and profenofos respectively. Furthermore, micro encapsulated formulations of endosulfan, assumed safer than the EC formulations, are being tested. They are to be recommended in the near future.

IRM programmes with new insecticides such as spinosad (48 g/ha) and indoxacarb (25 g/ha) proved as effective as the earlier IRM programmes. Various benefits related to these new insecticides strongly advise their use as alternatives to endosulfan or profenofos by following a rational rotation plan. To be widely adopted, these insecticides should present more attractive costs to farmers. In addition, actual interests are focusing on some insecticides which are able to control both exocarpic and endocarpic bollworm species, *H. armigera* as well as *P. gossypiella* and *C. leucotreta*. With this respect, novaluron (50-100 g/ha) and méthoxyfenozide (240 g/ha) are ending two-year trials. In the pyrethroid resistance prevention plan, these two insecticides could be used preferably at the fruiting stage in contrast to endosulfan, which is restricted to the vegetative stage.

Conjoining laboratory activities are being achieved to help set more reliable strategies and improve the whole pest management strategy. Bioassays performed with other classes of insecticides, especially alternate non-pyrethroid insecticides such as DDT, endosulfan, profenofos, indoxacarb, and spinosad did not show any cross-resistance with pyrethroids in *H. armigera* (Martin, unpublished data). With regard to the pyrethroid resistance mechanism there is evidence that resistance extended to all pyrethroids tested may be due to increased metabolic detoxification as resistance could be eliminated by treatment with pyrethroid and

Table 3: LD₅₀ and Resistance Factor (RF) for deltamethrin on field strain collected in various localities in 1998, 1999 et 2000.

Collection sites	Date	n	LD ₅₀ (µg/g)	Confidence intervals 95 %	slope ± se	R.F.
Bouaké	susceptible	-	0,046	0,039-0,055	2,10 ± 0,26	-
Bouaké	Juillet 98	180	0,910	0,448-1,849	1,02 ± 0,24	23
Bouaké	Mars 99	160	0,815	0,502-1,127	1,58 ± 0,33	18
	Octobre 99	120	1,740	1,187-2,649	1,52 ± 0,31	38
	Novembre 99	160	0,833	0,416-1,276	1,22 ± 0,28	18
Bouaké	Avril 00	120	0,418	0,136-0,814	0,95 ± 0,18	9
	Octobre 00	120	0,588	0,418-0,758	1,56 ± 0,22	13
	Novembre 00	120	0,320	0,115-0,658	1,58 ± 0,36	8
	Décembre 00	120	0,303	0,068-0,578	1,53 ± 0,37	7
Sarhala	Aug-98	180	0,453	0,185 - 1,112	0,71 ± 0,26	10
Ouangolo	Oct-98	180	0,777	0,491 - 1,228	1,60 ± 0,41	17
Niofoin	Oct-99	240	1,057	0,768 - 1,449	1,41 ± 0,21	23
Mankono	Oct-00	180	0,299	0,151 - 0,466	1,66 ± 0,25	7

Table 4: Comparison of effectiveness of alternate non pyrethroid insecticides

Active ingredients (g/ha)	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Dysdercus vålkeri</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	<i>H. armigera</i>	<i>Earias insulana</i>	% bored organs	Endocarpic species
Deltaméthrine 12	48.83 bcd	165.67 ab	1.50 ab	4.33 bc	1.00 c	32.35 ab	5.38 a
Indoxacarb 25	43.33 bc	181.67 ab	0.67 a	4.83 bc	0.67 abc	39.45 b	11.83 c
Spinozine 48	56.83 d	273.00 c	0.83 a	2.67 ab	0.17 ab	18.84 a	5.67 a
Profénofos 750	36.83 b	187.00 ab	1.00 a	2.67 ab	0.17 ab	36.84 b	9.41 abc
Endosulfan 750	36.83 b	222.67 bc	1.00 a	1.67 a	0.00 a	21.18 a	6.31 abc
Thiodicarb 750	51.50 cd	145.67 a	0.33 a	6.33 c	0.83 bc	30.07 ab	11.61 bc
Chlorpyr. éthy/750	22.17 a	127.5 a	2.67 b	5.33 c	1.17 c	43.53 b	6.22 ab
Isoxathion 600	57.17 d	133.67 a	0.67 a	3.50 abc	0.17 ab	45.38 b	6.05 abc
Transformation			Sqr(x+1)	Sqr(x+1)	Sqr(x+1)	Sqr(x+1)	Sqr(x+1)
F	8.58	6.85	3	3.83	3.84	3.49	2.32
CV	22.58%	25.53%	23.71%	20.29%	18.11%	19.81%	23.83%
Signification (5%)	HS	HS	S	HS	HS	HS	S

piperonyl butoxide (Martin et al. 2000). Further studies are now being performed to investigate the biochemical mechanisms of pyrethroid resistance in *H. armigera* in Côte d'Ivoire.

CONCLUSION Laboratory data suggested that the strategically restricted use of pyrethroids on *H. armigera* has limited selection for resistance. On the whole, the wide use of alternate insecticides such as endosulfan or profenofos on cotton crops reduced the selection pressure of pyrethroids on *H. armigera*. Other pyrethroid alternatives such as spinosad, indoxacarb, and thiodicarb could be used in the first stage as well. The relatively low levels of field infestations due to *H. armigera* over the last two years confirmed the success of the adoption of the resistance management programmes evolved over the whole cotton zones in Côte d'Ivoire.

The overall positive results obtained from the nationwide development of "window" programmes supported the rational use of insecticides. For the resistance management to be sustainable, there is a clear need to educate cotton farmers in Côte d'Ivoire in order to allow them use rationally alternative non pyrethroid insecticides. Farmers need to perform spray thresholds during the cotton vegetative stage on the

basis of crop scouting in order to reduce costs and avoid unnecessary applications. To achieve this purpose, farmers need appropriate field diagnostic tools and techniques for monitoring, along with other facilities such as educational materials illustrated with simple texts and colour photographs of pests and their damage that will aid individual decision-making. It is recommended that the *H. armigera* resistance management strategy on cotton be applied to other crops, especially vegetable crops, where large amounts of pesticides are used, and alternatives to chemical control should focus on varietal resistance characters.

ACKNOWLEDGEMENTS We acknowledge the cotton development companies of Côte d'Ivoire (CIDT, IC, LCCI) for their financial support and the technical assistance of their research and development staff in collecting field data. Chemical samples were provided by Aventis, Dow AG, Syngenta, Dupont, Calliope, ALM, and STEP.

REFERENCES

- Armes, N.J., S.K. Banerjee, K.R. de Souza, D. Jadhav, A.B. King, K.R. Kranthi, A. Regupathi, T. Surulivelu and N. Venugopal-Rao (1994). Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* in India: Recent developments. Proc. British Crop Protection Conference, Brighton. Pests and Diseases, 1:437-442.
- Collins, M.D. (1986). Pyrethroid resistance in the Cotton Bollworm *Heliothis armigera*: a case history from Thailand. Proc. British Crop Protection Conference, Brighton. Pests and Diseases, 2:583-589.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd. Ed.) Cambridge Univ. Press, Cambridge. 333 Pp.
- Gunning, R.V., C.S. Easton, L.R. Greenup and V.E. Edge (1984). Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) in Australia. J. Econ. Ent. 77:1283-1287.
- Gunning, R.V. and C.S. Easton (1994). Endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Aust. Ent. Soc., 33, 9-12.
- Martin, T., G.O. Ochou, N.F. Hala, J.M. Vassal and M. Vaissayre (2000). Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), in West Africa. Pest Management Science, 56, 549-554.
- McCaffery, A.R., A.B.S. King, A.J. Walker and H. El-Nayir (1989). Resistance to synthetic pyrethroids in the bollworm, *Heliothis armigera*, from Andhra Pradesh, India. Pesticide Science 27:65-76.
- McCaffery, A.R. and A.R. Walker (1991). Insecticide resistance in the bollworm *Helicoverpa armigera* from Indonesia. Pesticide Science 32:85-90.
- Ochou, O.G. (1994). Decision making for cotton insect pest management in Côte d'Ivoire. PhD Thesis, Imperial College, London. 306 Pp.
- Ochou, O.G., T. Martin and N.F. Hala (1998). Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa. Proceedings of the world Cotton Research Conference-2. Athens, Greece, September 6-12, pp 833-837.
- Ochou, O.G. and T. Martin (2000). Prévention et gestion de la résistance de *Helicoverpa armigera* (Hübner) aux pyréthrinoides en Côte d'Ivoire. 2ème Rapport d'exécution technique du projet régional PR-PRAO. 93 p.
- Riley, M. (1990). Pyrethroid resistance in *Heliothis* spp. In: Managing Resistance to Agrochemicals. M.B. Green, H.M. le Baron and W.K. Moberg (Ed). American Chemical Society Symposium Series 421. Washington. Pp. 134-148.
- Shen, J., Y. Wu, J. Tan and F. Tan (1992). Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) in China. Resistant Pest Management. 4:22-23.
- Sawiki, R.M. and I. Denholm (1987). Management of resistance to pesticides in cotton pests. Tropical Pest Management 33 (4):262-272.
- Vaissayre, M., G. Sement and J.P. Trijau (1984). Aspects phytosanitaires de la culture cotonnière en Côte d'Ivoire, d'après le réseau d'essais à trois niveaux de protection. Cot. Fib. Trop., 39(2):1-7.
- Vassal, J.M., M. Vaissayre and T. Martin (1997). Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. Resistant Pest Management, 9, 2, 14-15.

G. O. Ochou

CNRA, Centre National de Recherche Agronomique
01 BP 633 Bouaké 01
Côte d'Ivoire

T. Martin

CNRA, Centre National de Recherche Agronomique
01 BP 633 Bouaké 01
Côte d'Ivoire
and
CIRAD
Montpellier
France

Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa

ABSTRACT *Helicoverpa armigera* is the major insect pest of cotton in Africa, Asia, and Australia. Populations recently developed resistance to pyrethroids in West Africa via the overproduction of cytochrome P450 leading to treatment failures. One way to overcome this problem and to revert the resistance is the use of antiresistant compounds, more active against the resistant individual than against susceptible one. We found an organophosphate that has this antiresistant property, the triazophos. This insecticide is currently used to manage resistance in West African *H. armigera*.

KEY WORDS *Helicoverpa armigera*, resistance, insecticides, cotton, West Africa.

INTRODUCTION In West Africa, *Helicoverpa armigera* (Hübner) is an important pest of cotton and vegetable crops. Pyrethroids were used for control in the field for the beginning of 1980s. In 1996, following the failure of treatments to control *H. armigera*, pyrethroid resistance was diagnosed (Vassal et al. 1997). Cases of resistance have already been reported in *H. armigera* in Australia (Gunning et al., 1984), Thailand (Ahmad and McCaffery, 1988), India (McCaffery et al. 1989), Turkey (Ernst and Dittrich, 1992), Indonesia (McCaffery et al. 1991), and China (Shen et al. 1992). The two most frequently encountered mechanisms of resistance is nerve insensitivity (related to the presence of *kdr* gene) and metabolic detoxification involving oxidases or esterases (McCaffery, 1998). In all African

and it is possible that this may have increased the number of generations of *P. infestans* within each season and favoured the buildup of resistant strains (Fig. 3). In 2002, DARD and Syngenta agreed revised recommendations for phenylamide usage: growers were advised to use no more than two applications per season and to switch to an alternative product type no later than 15 July. Subsequently, the proportion of isolates containing resistant strains declined from 76% in 2001 to 60% in 2002. These grower recommendations will be continued in 2003 and the incidence of resistant strains again monitored. It is concluded that in a region such as Northern Ireland, where fit phenylamide-sensitive and -resistant strains of *P. infestans* co-exist, resistance may be managed by a strategy of limited use of phenylamides early in the season only. During the winter period when the pathogen survives in infected tubers, more resistant than sensitive strains tend to be lost by tuber rotting and this helps to stabilise the situation (Walker and Cooke, 1990). However, in regions where aggressive phenylamide-resistant strains have been introduced by migration rather than *in situ* selection, as occurred recently in Taiwan (Deahl et al, 2002), such resistance management may not be possible.

REFERENCES

- Cooke, L.R. 1981. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in Northern Ireland. Proceedings 1981 British Crop Protection Conference - Pests and Diseases 2:641-649.
- Cooke, L.R. 1986. Acylalanine resistance in *Phytophthora infestans* in Northern Ireland. Proceedings of the 1986 British Crop Protection Conference - Pests and Diseases 2:507-514.
- Cooke, L.R., Little, G., Wilson, D.G. and Thompson, D. 2000. Up-date on the potato blight population in Northern Ireland - fungicide resistance and mating type. Fourth Workshop of an European Network for Development of an Integrated Control Strategy of potato late blight. Oostende, Belgium, 29 September - 2 October 1999. PAV-Special Report no. 6, 35-45.
- Deahl, K.L., Cooke, L.R., Black, L.L., Wang, T.C., Perez, F.M., Moravec, B.C., Quinn, M. and Jones, R.W. 2002. Population changes in *Phytophthora infestans* in Taiwan associated with the appearance of resistance to metalaxyl. Pest Management Science 58:951-958.
- Dowley, L.J., Cooke, L.R. and O'Sullivan, E. (1995). Development and monitoring of an anti-resistance strategy for phenylamide use against *Phytophthora infestans*. In *Phytophthora infestans*. pp. 130-136. Eds.
- Dowley, L.J., Bannon, E., Cooke, L.R., Keane, T. & O'Sullivan, E. Boole Press, Dublin. 382 pp. Dowley, L.J. and O'Sullivan, E. 1981. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. Potato Research 28:417-421.
- Walker, A.S.L. and Cooke, L.R. 1990. The survival of *Phytophthora infestans* in potato tubers - the influence of phenylamide resistance. Proceedings Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases - 1990 3:1109-1114.

Louise R. Cooke

Applied Plant Science Division
Department of Agriculture and Rural Development
Newforge Lane Belfast, BT9 5PX
United Kingdom

Research in Resistance Management

Activity Spectrum of Spinosad and Indoxacarb: Rationale for an Innovative Pyrethroid Resistance Management Strategy in West Africa

ABSTRACT To face pyrethroid resistance in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner), endosulfan (700 g/ha) has been used in a resistance management strategy for four years in Côte d'Ivoire, West Africa. Actually, its recommendation is being questioned with regard to its acute toxicity and environmental issues. Earlier prospects revealed that insecticides such as spinosad (48 g/ha) and indoxacarb (25 g/ha) proved as effective as endosulfan in controlling *H. armigera*. In contrast to endosulfan, the activity spectrum of these non-pyrethroids insecticides appears to be restricted to a few bollworm and leaf pests. The present study pointed out the strength and weakness of these new insecticides with respect to major insect pests and beneficial species. On the basis of their activity spectrum and in the light of cotton crop phenology and main pest seasonal occurrence, a differential scheme was designed. Indoxacarb is more appropriate to the fruiting stage (101-115 DAE (Day After Emergence)) as it appeared very effective against the cotton stainer *Dysdercus voelkeri* (Schmidt) while showing lower performance against *Earias* spp and the mite *Polyphagotarsonemus latus* (Bank). In contrast,

spinosad is to be used preferably at the vegetative stage (45-66 DAE) as it proved safer to coccinellids, more effective against *Earias* spp while its lower effectiveness against *D. voelkeri* suggests avoiding its positioning at a late stage of cotton. Various benefits related to these new insecticides strongly advise their use as alternatives to pyrethroids. Still, to be more attractive, their activity needs to be reinforced by other insecticides in such a way to control the whole arthropod pest complex.

KEY WORDS: Cotton, *Helicoverpa armigera*, pyrethroid resistance management strategy, Spinosad, Indoxacarb, Côte d'Ivoire.

INTRODUCTION

The development of resistance in *H. armigera*:

Known as very effective in controlling *Helicoverpa armigera* (Hübner) and most cotton bollworm pests, pyrethroids have been widely used for more than twenty years in Côte d'Ivoire. Recently, laboratory data obtained on *H. armigera* strains within 1996-1998 pointed out significant increase in the LD50

for both deltamethrin (Figure 1) and cypermethrin (Vassal et al., 1997; Vaissayre et al., 1998; Martin et al., 2000). Field data recorded for eight consecutive years (Figure 2) revealed that the pest infestation profiles changed deeply from 1991 to 1998 (Ochou et al., 1998). Moreover, cases of ineffectiveness of the pest control programme against *H. armigera* have been reported during exceptional pest outbreaks in Côte d'Ivoire. With this regard, the routine calendar-based programme applying six fortnightly sprays of pyrethroid-organophosphate insecticide mixtures over the whole cotton season has been questioned as the pyrethroid resistance in *H. armigera* was confirmed (Ochou & Martin, 2000). Similar cases of resistance were reported in *H. armigera* in most West African countries (Benin, Burkina Faso, Guinea, Mali, Senegal, and Togo) (Anonymous, 1999).

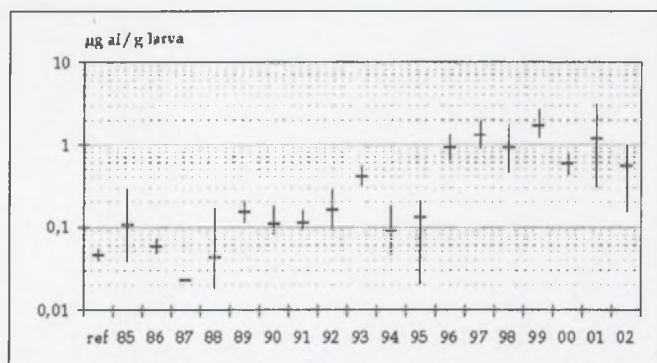


Figure 1: LD₅₀ survey of deltamethrin from 1985 to 1998 with topical application tests on *Helicoverpa armigera* Bouaké strain

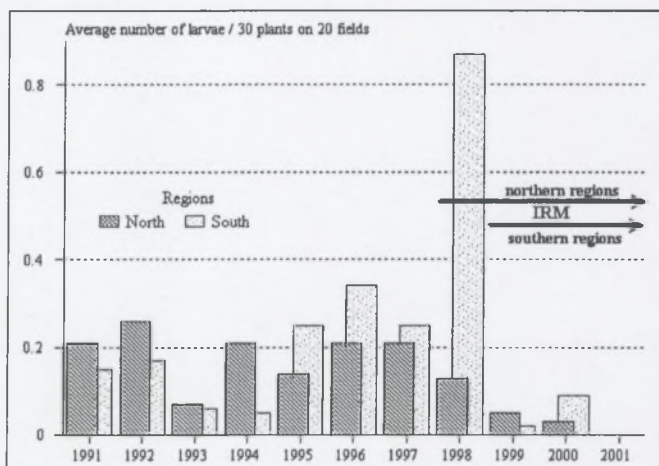


Figure 2: Annual variations of average field infestation levels of *H. armigera* in cotton areas of Côte d'Ivoire before and after IRM

Development of the IRM strategy against *H. armigera*:

To face pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *H. armigera*, an Insect Resistance Management (IRM) programme, inspired from the "Australian" strategy (Sawicki and Denholm, 1987),

was designed in Côte d'Ivoire. In practice, the strategy has led to the determination of a pyrethroid-free season nationwide by using non-pyrethroid insecticides (endosulfan 700-750g/ha and profenofos 750 g/ha) in a kind of "window" programme in order to lessen pyrethroid selection pressure. The pyrethroid-free season is established according to cotton growing zones (August 10 and August 20 respectively for northern and southern regions). The main picture which has come out from the nationwide adoption of the pyrethroid resistance management programme by cotton farmers is the important decrease in the field populations of *H. armigera* (Figure 2) since 1998 (Ochou & Martin, 2002).

Endosulfan has been widely used in the current pyrethroid resistance management programme over the last four years in Côte d'Ivoire, and so far, no resistance to endosulfan has been detected (Martin et al., 2002). However, its recommendation is being actually questioned with regard to its toxicity, environmental issues, and farmer practices. To tackle this problem, investigations are being undertaken to adapt a relatively low dose of endosulfan (525 g/ha) to the actual field infestation of *H. armigera* (Ochou & Martin, 2000) and to assess microencapsulated formulations of endosulfan, assumed safer than the EC formulations. At the same time, further investigations focused on new insecticides such as spinosad and indoxacarb as potential alternatives to endosulfan. Spinosad is a naturally produced mixture of the actinomycete *Saccaropolyspora spinosa*. Its mode of action is described as an activation of the nicotine acetylcholine receptor, but at a different site from nicotine or imidachloprid. It is activated by contact and ingestion, causing paralysis (Pesticide Manual, 12th edition, v2). Indoxacarb is an oxadiazine product where the active component blocks sodium channels in nerve cells. It is activated by contact and ingestion, and affected insects cease feeding, with poor co-ordination, paralysis, and ultimately death (Pesticide Manual, 12th edition, v2). Due to their novel mode of action, both insecticides appear ideal for resistance management programmes. However, to be rationally used, there is a need for a precise activity spectrum of these new insecticides that proved as effective as endosulfan in controlling *H. armigera* (Ochou & Martin, 2002).

The present study is to assess the activity spectrum of spinosad and indoxacarb with regard to beneficials and major components of the cotton pest complex in Côte d'Ivoire. The need to reinforce their activity by other insecticides will be also assessed. On the basis of the strength and weakness of these new insecticides and with respect to cotton crop phenology and seasonal occurrence of main pests, appropriate recommendations will be stated to justify their integration into the pyrethroid resistance management programmes.

MATERIALS and METHODS The study was carried out for three consecutive years (1999-2001) at the cotton research station of CNRA based at Bouaké and at the experimental station of LCCI at Nambingué. At first, the biological activity of the two specific insecticides (spinosad 48g/ha (Laser 480 SC, Dow AgroSciences) and indoxacarb 25g/ha (Avaunt 150 SC, Du Pont)) was assessed in reference with endosulfan 750 g/ha (Phaser 375 EC, Aventis), and deltamethrin 12 g/ha (Decis 12 EC, Aventis) through a Complete Bloc Design with six replicates. Individual plots were of 10 rows x 15 m. Further field trials were undertaken in a similar design with the two insecticides in association with other insecticides. Tested mixtures included spinosad 48g/ha + profenofos 300g/ha, spinosad 48g/ha + acetamiprid 10g/ha, indoxacarb 25g/ha + profenofos 300g/ha, indoxacarb 25g/ha + acetamiprid 10g/ha, and cypermethrin 36g/ha + profenofos 300g/ha.

Insecticides sprays were performed with an adapted horizontal boom knapsack sprayer debiting 60 l/ha of product-water mixture. Plots were treated every 14 days from 45th to 115th DAE (day after emergence of cotton). Fields were scouted directly on plants once a week from 30th to 122nd DAE for sucking pests, leafworms, and exocarpic bollworms pests, and every two weeks on green bolls from 70th to 112th DAE for endocarpic bollworms. Target pests and beneficials were recorded as follows:

1. mite *Polyphagotarsonemus latus* infested plants p. 3 rows x 15m;
2. aphid *Aphis gossypii* infested plants p. 3 rows x 15m;
3. jassid *Jacobiella fascialis* infested plants p. 30 plants;
4. individual sucking pests (*Dysdercus voelkeri*, *Bemisia tabaci*), leafworms (*Spodoptera littoralis*, *Anomis flava*, *Sylepte derogata*), and exocarpic bollworms (*H. armigera*, *Earias* spp, *Diparopsis watersi*) p. 30 plants;
5. endocarpic bollworms (*Cryptophlebia leucotreta*, *Pectinophora gossypiella*) p. 100 green bolls; and
6. individual beneficials (ladybirds, spiders, etc.) p. 30 plants.

Three year average data for all bollworms and one-two year average data for sucking pests, leaf pests, and beneficials were considered.

RESULTS

Effectiveness of spinosad and indoxacarb against cotton bollworms:

Data presented in Figures 3a-d show compared effectiveness of the pyrethroid deltamethrin and the non pyrethroid insecticides on cotton exocarpic bollworm species (*H. armigera*, *Earias* spp., *D.*

watersi) and endocarpic bollworm species (*C. leucotreta* and *P. gossypiella*).

Spinosad activity on the exocarpic bollworm species was at least equivalent to endosulfan as a reference: *H. armigera* (3.1 vs 3.4 larvae p. 30 plants), *Earias* spp, and *D. watersi*. Overall activity of spinosad against the exocarpic bollworm species was higher than deltamethrin. Indoxacarb activity was at the level of deltamethrin for *H. armigera* (4.9 vs 5.1 larvae p. 30 plants), and to a certain extent less effective against *Earias* spp. In contrast, the activity of both insecticides (spinosad and indoxacarb) on endocarpic species remained low in relation to deltamethrin (6.4 and 7.1 vs 3.2 endocarpic larvae p. 100 bolls, respectively for spinosad, indoxacarb, and deltamethrin).

Effectiveness of spinosad and indoxacarb against sucking pests:

Data presented in Figures 4a-d reveal compared activity of the pyrethroid deltamethrin and the non pyrethroid insecticides on cotton sucking pests *J. fascialis*, *A. gossypii*, *D. voelkeri*, and the mite *P. latus*.

The effect of spinosad was at least equivalent to deltamethrin on the jassid *J. fascialis* (1.2 vs 1 jassid attacked plants p. 30 plants) and on the mite *P. latus* (4 mite infested plants p. 3 rows). In contrast, spinosad appeared less effective than endosulfan against the aphid *A. gossypii* (56.8 vs 36.8 aphid infested plants p. 3 rows) and the cotton stainer *D. voelkeri* (169 vs 140.8 *Dysdercus* p. 30 plants). Contrary to spinosad, the effect of indoxacarb was equivalent to deltamethrin on *D. voelkeri* (110.3 vs 101.8 *Dysdercus* p.30 plants) and on the aphid *A. gossypii* (43.3 vs 48.8 aphid infested plants p. 3 rows) while showing less effectiveness compared to endosulfan against the mite *P. latus* (11.5 vs 2.4 mite infested plants p. 3 rows).

Effectiveness of spinosad and indoxacarb against cotton leafworms:

Data presented in Figures 5a-b show the compared effect of the pyrethroid deltamethrin and the non pyrethroid insecticides on cotton leafworm *S. littoralis* and *A. flava*.

Spinosad and indoxacarb proved very effective against the leafworm *S. littoralis* (0.7 and 0.8 vs 1.5 larvae p. 30 plants, respectively for indoxacarb, spinosad, and deltamethrin). Their activity of on *A. flava* remained equivalent to deltamethrin and endosulfan (1.2 and 2.2 vs 1.8 larvae p. 30 plants, respectively for spinosad, indoxacarb, and endosulfan).

Activity of spinosad and indoxacarb on beneficials:

Figures 6a-b show data on the compared activity of the pyrethroid deltamethrin and the non pyrethroid insecticides on beneficial predators.

Spinosad and indoxacarb to a lesser extent proved safer on ladybirds, *Coccinella* spp., as compared to endosulfan (10.7 and 5.8 respectively for spinosad and

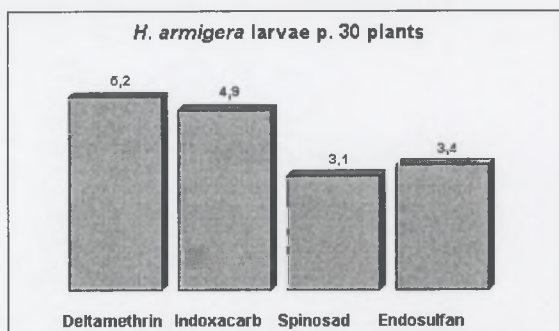


Figure 3a: Compared activity of insecticides on *Helicoverpa armigera*

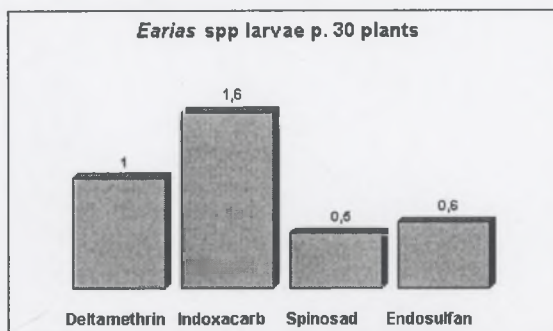


Figure 3b: Compared activity of insecticides on *Earias* spp

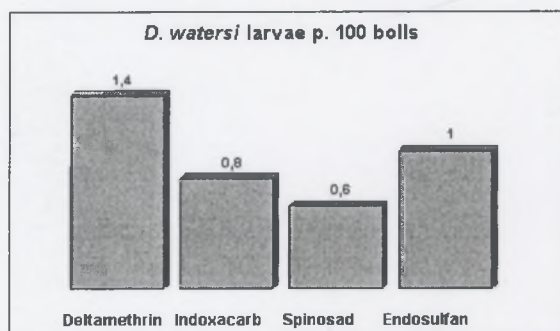


Figure 3c: Compared activity of insecticides on *Diparopsis watersi*

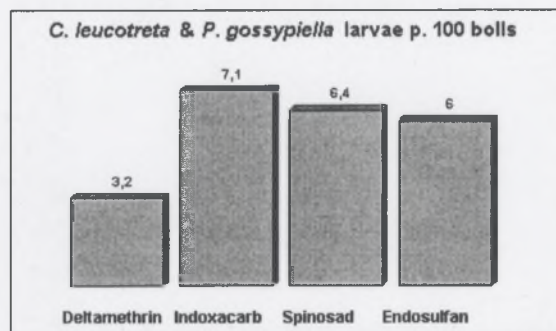


Figure 3d: Compared activity of insecticides on endocarpic bollworms

Figure 3 : Compared effectiveness of spinosad and indoxacarb against cotton bollworms in Côte d'Ivoire

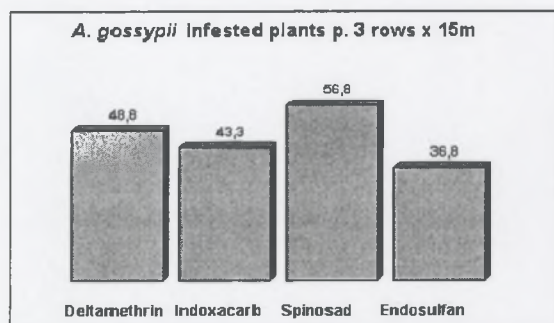


Figure 4a: Compared activity of insecticides on *Aphis gossypii*

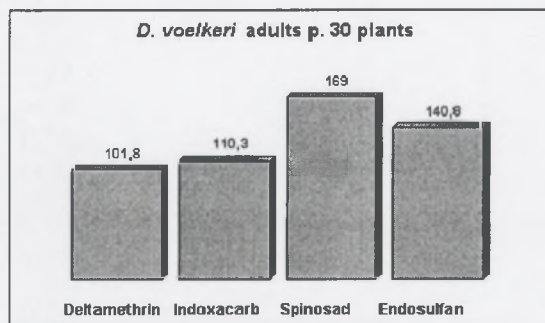


Figure 4b Compared activity of insecticides on *Dysdercus voelkeri*

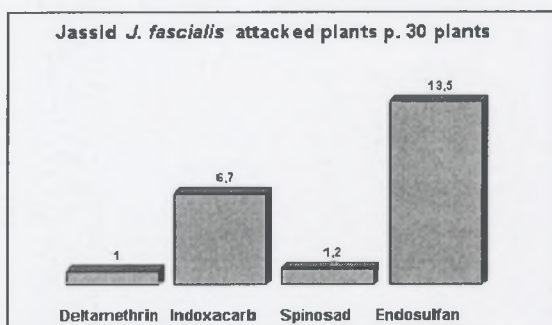


Figure 4c: Compared activity of insecticides on *Jacobiella fascialis*

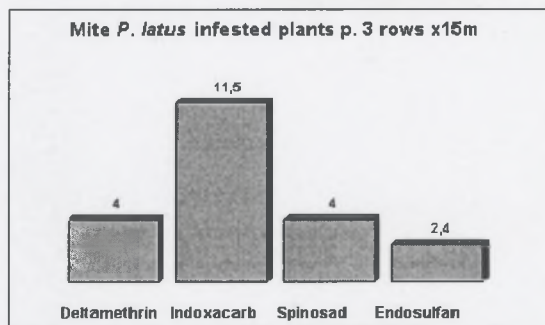


Figure 4d: Compared activity of insecticides on *Polyphagotarsonemus latus*

Figure 4 : Compared effectiveness of spinosad and indoxacarb against cotton sucking pests in Côte d'Ivoire

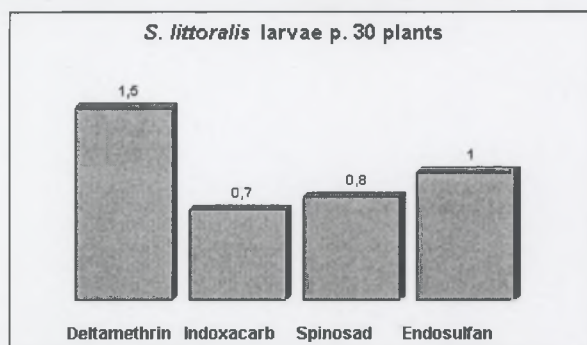
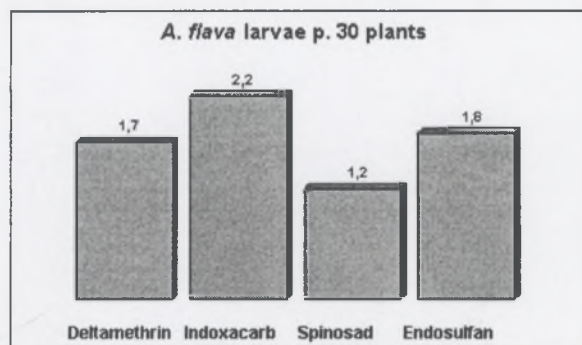
Figure 5a: Compared activity of insecticides on *Spodoptera littoralis*Figure 5b: Compared activity of insecticides on *Anomis flava*

Figure 5: Compared effectiveness of spinosad and indoxacarb against cotton leafworm pests in Côte d'Ivoire

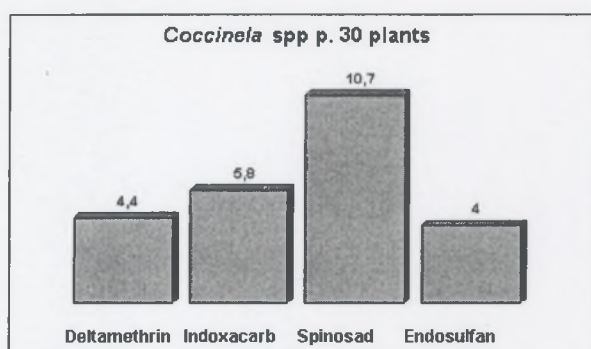
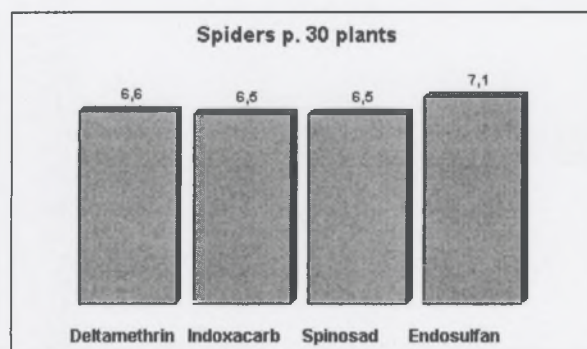
Figure 6a: Compared activity of insecticides on *Coccinella* spp

Figure 6b: Compared activity of insecticides on spiders

Figure 6: Compared activity of spinosad and indoxacarb on beneficials in Côte d'Ivoire

indoxacarb vs 4 coccinellids p.30 plants). The effect of both insecticides on the spiders was equivalent to endosulfan (6.5 vs 7 spiders p.30 plants).

Effectiveness of spinosad and indoxacarb in mixture with other insecticides:

Data presented in Figures 7a-d showed compared activity of spinosad or indoxacarb based associations with profenofos and acetamiprid, and pyrethroid based associations on cotton bollworms and some sucking pests.

The profenofos based association with spinosad or indoxacarb provided an activity level at least equivalent to cypermethrin-profenofos association against *H. armigera* (0.3 and 1 vs 1.1 larva p. 30 plants, respectively for indoxacarb-profenofos, spinosad-profenofos and cypermethrin-profenofos). The same tendency was observed against the mite *P. latus* (0.1 and 2.5 vs 2.9 mite infested plants p. 3 rows).

The acetamiprid-based association with spinosad was at least equivalent to the cypermethrin-acetamiprid association against *D. voelkeri* (74.2 vs 90.7 Dysdercus p. 30 plants). This association was much more effective against *D. voelkeri* than the indoxacarb-acetamiprid association (109.3 Dysdercus p. 30 plants). Concerning the endocarpic bollworm species (*C. leucotreta* & *P.*

gossypiella) the spinosad-acetamiprid association showed an activity level equivalent to the cypermethrin-acetamiprid (4 vs 2 larvae p. 100 bolls) while the activity remained very low for the indoxacarb-acetamiprid association (9.5 larvae p. 100 bolls).

DISCUSSION The present study pointed out the strengths and weaknesses of spinosad and indoxacarb with respect to major insect pests and beneficial species. The activity of spinosad and indoxacarb varied significantly according to insect pest species or beneficial species.

The spinosad activity spectrum comprised exocarpic bollworm species (*H. armigera*, *Earias* spp, and *D. watersi*) and cotton leafworms *S. littoralis* and *A. flava*. It appeared to have a certain activity against the endocarpic bollworm species (*C. leucotreta* & *P. gossypiella*), the jassid *J. fascialis*, and the mite *P. latus*. This activity noticed especially on sucking pests such as the jassid *J. fascialis* and the mite *P. latus* need to be confirmed in more field trials, for the manual pesticide states that spinosad is non toxic to sucking pests. Indeed, spinosad appeared very limited against the aphid *A. gossypii* and the cotton stainer *D. voelkeri*. With regard to beneficials, spinosad proved safer to *Coccinella* spp and spiders.

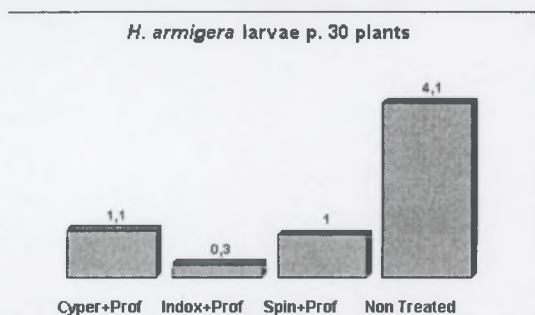


Figure 7a : Compared activity of profenofos based mixtures with spinosad and indoxacarb on *Helicoverpa armigera*

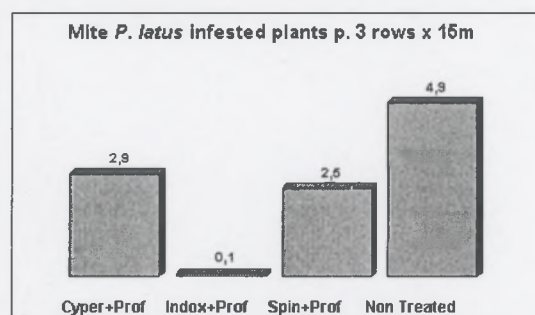


Figure 7b: Compared activity of profenofos based mixtures with spinosad and indoxacarb on *Polyphagotarsonemus latus*

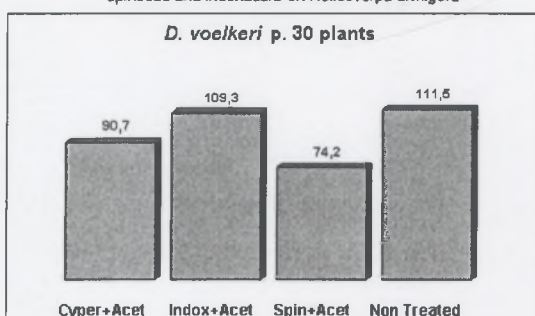


Figure 7c : Compared activity of acetamiprid based mixtures with spinosad and indoxacarb on *Dysdercus voelkeri*

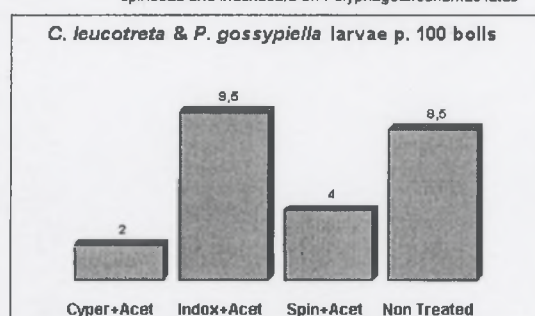


Figure 7d : Compared activity of acetamiprid based mixtures with spinosad and indoxacarb on endocarpic bollworms

Figure 7 : Compared activity of profenofos or acetamiprid based mixtures with spinosad and indoxacarb on cotton pests in Côte d'Ivoire

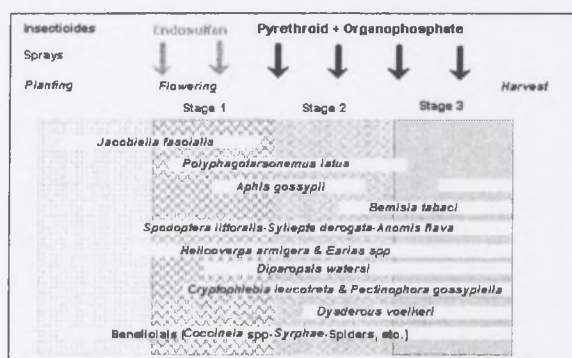


Figure 8a: Endosulfan based IRM programme

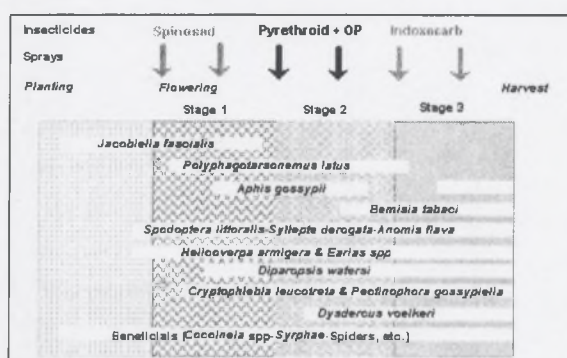


Figure 8b: Spinosad and indoxacarb based IRM programme

Figure 8: Current and innovative pyrethroid management programmes

In contrast to spinosad, indoxacarb activity spectrum was restricted to a few bollworm species (*H. armigera*, *D. watersi*) and the cotton leafworm *S. littoralis*. In addition, it appeared to have a certain effectiveness against the jassid *J. fascialis*, the aphid *A. gossypii*, and the cotton stainer *D. voelkeri*. Indoxacarb appeared somehow inactive on *Earias* spp., the mite *P. latus*, and the endocarpic bollworm species (*C. leucotreta* & *P. gossypiella*).

On the basis of their activity spectrum and in the light of cotton crop phenology and seasonal occurrence of main pests, differential pyrethroid resistant management plans could be designed (Figures 8a-b)

considering the positioning of spinosad and indoxacarb either at the vegetative or fruiting stages of cotton.

Due to its high effectiveness on exocarpic bollworm species mainly *H. armigera* and *Earias* spp and its relative safety to major beneficials such as ladybird *Coccinella* spp, spinosad could be used preferably at cotton vegetative stage (45-66 d.a.e.). The relatively broad activity spectrum of spinosad makes it ideal for use at the vegetative stage of cotton, appearing as a true alternative to endosulfan. Its positioning at the late stage of cotton could be more suitable provided it would be used in association with other insecticides such as acetamiprid, effective against *D. voelkeri* and *A. gossypii*. Due to its activity

spectrum, which is relatively restricted in relation to spinosad, indoxacarb appears more appropriate to the cotton fruiting stage (101-115 d.a.e), as it proved effective against the cotton stainer *D. voelkeri* while showing lower performance against *Earias* spp and the mite *P. latus*. Association of indoxacarb with other insecticides such as profenofos could enhance its activity mainly on the mite *P. latus*. The use of indoxacarb is not advisable during the period that coincides with maximum flowering for it had a limited effect on endocarpic bollworm species (*C. leucotreta* and *P. gossypiella*) which occur in largest numbers at this stage; it is therefore necessary to maintain a pyrethroid based association in order to control endocarpic bollworm species.

Various benefits related to these new insecticides strongly advise their use as alternatives to pyrethroids. Still, to be more attractive, their activity needs to be reinforced by other insecticides in such a way as to control the whole arthropod pest complex. Conjoined laboratory activities are being achieved to help set more reliable strategies and improve the whole pest management strategy. Bioassays performed with several classes of insecticides, especially non pyrethroid insecticides such as DDT, endosulfan, profenofos, indoxacarb, and spinosad did not show any cross-resistance with pyrethroids in *H. armigera* (Martin, unpublished data), knowing that pyrethroid resistance in *H. armigera* from West Africa was due to greater degradation of pyrethroids involving oxidases from the P450 family (Martin et al., 2002).

CONCLUSION The earlier use of endosulfan and profenofos as pyrethroid alternatives in *H. armigera* resistance management in Côte d'Ivoire helped substantially reduce field infestations of *H. armigera* for the last four years. No resistance was detected for endosulfan and profenofos in field populations indicating the success of these pyrethroid alternatives. However, endosulfan and profenofos resistance was shown in *H. armigera* from Pakistan (Ahmad et al., 1995) and Australia (Forrester et al., 1993; Gunning et al., 1993) indicating the risk to select resistant larvae in Côte d'Ivoire if those insecticides are to be used for years without alternatives. For the pyrethroid resistance management to be sustainable, there is a clear need to adopt alternative insecticides such as spinosad and indoxacarb in a rational non pyrethroid insecticide rotation plan. Spinosad and indoxacarb could be used in appropriate resistance management programmes either alone or reinforced in mixture by other insecticides or in mosaic with endosulfan and profenofos in such a way to avoid the selection of new cases of resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS The authors acknowledge the research and development staff of cotton companies of Côte d'Ivoire (CIDT, IC, LCCI) and MM. Konan K.

Jérôme, Kouadio René, and Kouadio Gérard of the cotton entomology technical research team of CNRA for their assistance in collecting field data. Thanks are due to chemical companies Dow AgroScience, Du Pont de Nemours, Aventis CropScience, and Syngenta for insecticide samples provided.

REFERENCES

- Ahmad, M., Arif, M.I., Ahmad, Z. 1995. Monitoring insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera Noctuidae) in Pakistan. *Journal of Economic Entomology*, 88 (4): 771-776.
- Forrester, N.W., Cahill, M., Bird, L. J. and Layland, J. K. (1993) Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. In *Bull. Entomol. Res. Supplement Series N°1*. International Institute of Entomology pp. 1-132.
- Gunning, R. V. and Easton, C. S. (1993). Resistance to organophosphate insecticides in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *General Applied Entomology*, 25: 27-34.
- Martin, T., Ochou, G.O., Hala, N.F., Vassal, J.M. and Vaissayre, M. (2000). Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), in West Africa. *Pest Management Science*, 56, 549-554.
- Martin, T., Chandre, F., Ochou, O. G., Vaissayre, M. and Fournier, D. (2002). Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pesticide Biochemical Physiology*, 74 : 17-26.
- Martin, T., Ochou, O. G., Vaissayre, M. and Fournier, D. (2002). Positive and Negative Cross-resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from West Africa. *Resistant Pest Management Newsletter*, 12, 1.
- Ochou, O.G., Martin, T. and Hala, N.F (1998). Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa. *Proceedings of the world Cotton Research Conference-2*. Athens, Greece, September 6-12, pp 833-837.
- Ochou, O.G. and T. Martin (2000). Prévention et gestion de la résistance de *Helicoverpa armigera* (Hübner) aux pyrèthroïdes en Côte d'Ivoire. 2ème Rapport d'exécution technique du projet régional PR-PAO. 93 p.
- Ochou, G. O. and Martin, T. (2002). Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner): Recent Developments and Prospects for its Management in Côte d'Ivoire, West Africa. *Resistant Pest Management Newsletter*, 12, 1.
- Sawiki, R.M. and I. Denholm (1987). Management of resistance to pesticides in cotton pests. *Tropical Pest Management* 33 (4):262-272.
- Vaissayre, M., Vassal, J. M. and Martin, T. (1998). Pyrethroid resistance in the bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in West Africa. *Proceedings of the World Cotton Research Conference-2*. Athens, Greece, September 6-12, pp. 701-705.
- Vassal, J.M., M. Vaissayre and T. Martin (1997). Decrease in the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) to pyrethroid insecticides in Côte d'Ivoire. *Resistant Pest Management*, 9, 2, 14-15.

O.G. Ochou

Centre National de Recherche Agronomique (CNRA)
01 BP 633 Bouaké 01
Côte d'Ivoire

T. Martin

Centre National de Recherche Agronomique (CNRA)
01 BP 633 Bouaké 01
Côte d'Ivoire

Centre de Coopération International en Recherche Agronomique
(CIRAD)
34398 Montpellier
France

Control of insecticide resistant bollworms in West Africa

Thibaud Martin^{1,2}, Germain O. Ochou², Angelo Djihinto³, Doulaye Traore⁴, Mamoutou Togola⁵, Maurice Vaissayre¹ and Didier Fournier⁶

- 1- CIRAD-CA, 34398, Montpellier cedex 5, France.
- 2- CNRA, 01 BP 633 Bouaké 01, Côte d'Ivoire.
- 3- Unité de Recherche Coton et Fibres, BP 715 Cotonou, République du Benin.
- 4- Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles, 01 B.P. 208 Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso.
- 5- Institut d'Economie Rurale, B.P. 16 Sikasso, Mali.
- 6- IPBS-UMR 5089, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse, France.

Cotton is one of the most important cash crops in West Africa and provides more than 50% of the income of agricultural communities, composed of more than two million small-scale farmers cultivating an average of only 1 ha. Income from cotton contributes in large part to the alleviation of poverty in West Africa. Cotton crops are damaged by a large number of insect species, the most harmful being the cotton bollworm *H. armigera* and large amounts of insecticide have been used to control this pest over the years. At early eighties, a new family of insecticide, the pyrethroids, were introduced. They were very efficient, extensively used and resulted in a significant increases in cotton production. However, since 1996 high infestations of *H. armigera* have been observed in some areas, suggesting field control failures of chemicals, due to the development of insecticide resistance. In 1998, there were uncontrollable pest infestations on cotton in all countries of West Africa resulting in yield decline, despite increased insecticide use. Suggestions of insecticide resistance in *H. armigera* were very alarming to West African cotton farmers since *H. armigera* resistance to pyrethroids in India and Pakistan had resulted in dramatic losses in cotton production and even driving some farmers to suicide.

Field studies indicated that the distribution of resistance was widespread. Subsequent laboratory studies showed a resistance factor as high as 100 fold and was consistent with the

field failures observed (1) and studies on the stability of resistance showed that pyrethroid resistance was not stable in insecticide-free conditions.

Biochemical analysis revealed that resistance was due to greater degradation of pyrethroids in resistant insects involving monooxidases from the P450 family (2). However, overproduction of oxidases proved to not affect the toxicity of another insecticide, endosulfan making a good alternative to pyrethroid use (3). On the other hand, organophosphates competes for oxidases, thus protecting pyrethroids from degradation in resistant insects (4) and are sometimes even activated by oxidases rendering them more efficient against the resistant insect (5).

West African cotton researchers have come together in a network and an insecticide resistance management strategy was proposed: endosulfan for the first two sprays to control pyrethroid resistant insects followed by four sprays of mixtures containing pyrethroids and organophosphates. It was important to maintain pyrethroid efficacy because of their low cost and effectiveness against other major pests. The resistance management strategy has been adopted by most West African farmers with the assistance of extension services provided by cotton marketing and insecticide distribution companies.

Results presented in figure 1 show how control of *H. armigera* proved successful during the first four years of widespread use of the strategy, as there were no longer any *H. armigera* field infestation problems on cotton in West Africa. The use of multiple chemicals also resulted in better control of the other cotton pests, such as aphids, whiteflies and leafhoppers, leading to an increase of cotton yields more than compensating for the cost of endosulfan. The resistance management strategy has been a success with resistance to pyrethroids stabilized at an intermediate level.

Several reasons explained the success of the strategy: 1) The organisation of a cotton network in West Africa enabled the implementation by the two million cotton farmers of an innovative insecticide resistance management strategy; 2) There was no cross-resistance between pyrethroids and the other insecticides used to control *H. armigera*; 3) The pyrethroid resistance in *H. armigera* resistance is associated with a fitness cost.

References

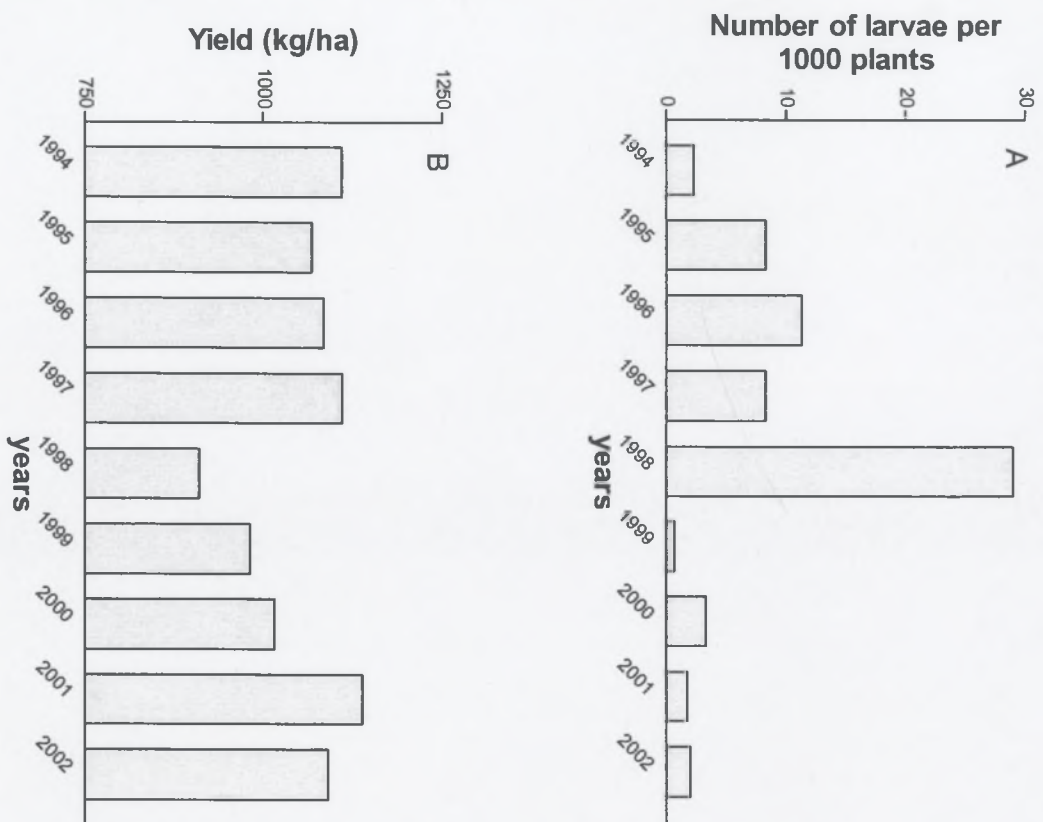
1. T. Martin, O.G. Ochou, N.F. Hala,, J-M.Vassal, M. Vaissayre, M. *Pest Management Sci.* **56**, 549 (2000).
2. T. Martin, F. Chandre, O.G. Ochou, M. Vaissayre, D. Fournier, *Pest. Biochem. Physiol.* **74**, 17 (2002).
3. T. Martin, O.G. Ochou, M. Vaissayre, D. Fournier, *Resistance Pest Management Newsletter* **12**, 16 (2002).
4. T. Martin, O.G. Ochou, M. Vaissayre, D. Fournier, *J. Econ. Entomol.* **96**, 469 (2003).
5. T. Martin, O.G. Ochou, M. Vaissayre, D. Fournier, *Insect Biochem. Mol. Biol.* In press

Figure legend

Figure 1: A: Field infestation of *H. armigera* caterpillars in Southern Côte d'Ivoire (mean of 16 observations in 200 fields). Insecticide Resistance Management was applied from 1999.

B: Yield of seed-cotton production in kg/ha in countries involved in the pest resistant management program (Benin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Senegal and Togo).

Figure 1



AUTEUR : Thibaud MARTIN

TITRE : La résistance aux insecticides de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en Afrique de l'Ouest : du mécanisme à la gestion

DIRECTEUR DE THESE : Pr Didier Fournier

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : IPBS, Université de Toulouse III, le 12 septembre 2003

RESUME

Plus de deux millions d'agriculteurs cultivent en moyenne 1 hectare de coton en Afrique de l'Ouest. Ils pratiquent une lutte chimique raisonnée contre un large spectre parasitaire. Au cours des années 1990, le principal ravageur *Helicoverpa armigera* est devenu résistant aux pyréthrinoides entraînant des échecs de traitement.

La première partie porte sur le diagnostic, le suivi de la résistance au champ et l'étude des mécanismes impliqués. Toutes les populations de terrain ont montré une résistance aux pyréthrinoides quel que soit le lieu, la plante hôte et la date de collecte. Mes travaux ont montré que la résistance serait due à une modification du mécanisme de dégradation des pyréthrinoides probablement liée à une surproduction d'oxydases.

Dans la seconde partie des molécules synergisantes ou antirésistantes ont été recherchées. Certains organophosphorés peuvent accroître la toxicité des pyréthrinoides sur les chenilles résistantes en étant probablement une cible concurrente pour les oxydases. Par ailleurs, la surproduction d'oxydases chez les insectes résistants entraînerait une augmentation de la toxicité du triazophos. Cette hypothèse repose sur le fait qu'une plus grande quantité de triazophos actif a été retrouvé chez les larves résistantes que chez les sensibles. Ces résultats sont autant d'outils pour gérer la résistance.

Une stratégie de gestion de la résistance en culture cotonnière est discutée dans la troisième partie. Elle recommande: 1) la suppression des pyréthrinoides jusqu'au 15 août pour limiter la sélection d'individus résistants chez la première génération, 2) les premiers traitements avec des insecticides alternatifs qui ne présentent pas de résistance croisée positive, 3) les derniers traitements avec des mélanges à base de triazophos ou d'autres organophosphorés synergisant pour accroître l'efficacité des pyréthrinoides. Cette stratégie a été utilisée avec succès par la grande majorité des planteurs de coton d'Afrique de l'Ouest de 1999 à 2002.

Mots clés : *Helicoverpa armigera*, résistance aux insecticides, pyréthrinoides, coton, Afrique de l'Ouest

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chimie

Insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) from West Africa: From mechanism to management

More than two million farmers are growing an average of 1 ha of cotton in West Africa. They use an IPM strategy to control a large number of insect species. In the mid-nineties resistance to insecticides in the major cotton pest, the bollworm *Helicoverpa armigera* resulted in field control failures.

The first part focuses on the pyrethroids resistance diagnosis, its monitoring and the study of the mechanism. Field populations of *H. armigera* were all pyrethroid resistant whatever the area, the host plant and the collecting date. Results showed that resistance was due to an increase in pyrethroid degradation probably involving oxidases from the P450 family

In the second part, synergistic mixtures and negative cross-resistant molecules are studied. Some organophosphates increased the pyrethroid toxicity in resistant larvae competing probably for the same oxidases involved in pyrethroid degradation. Moreover, the overproduction of these oxidases could make one of them, the triazophos, more efficient against the pyrethroid resistant insects. This hypothesis was supported by an overproduction of triazophos oxon in resistant larvae compared with susceptible ones. These results suggested means to overcome resistance.

An insecticide resistance management strategy for cotton crop was discussed in the third part. This strategy recommends: 1/ no pyrethroid spray before mid-August to avoid resistance selection during the first generation, 2/ first sprays with non cross-resistant molecules to control resistant insects, 3/ last sprays with pyrethroid in combination with triazophos or other synergistic organophosphate to increase pyrethroids toxicity. Most of cotton farmers in West African countries used this strategy with success from 1999 to 2002.

Key words: *Helicoverpa armigera*, insecticide resistance, pyrethroids, cotton, West Africa